

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KRISAN
(*Chrysanthemum cinerariiflorum*) SEBAGAI ANTIKANKER
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA (OSCC) TERHADAP
KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR - ALPHA (TNF- α)
SECARA IN VIVO**

SKRIPSI

Oleh :

AL MAZIDA FAUZIL AISHAQEENA

NIM. 17910002



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KRISAN
(*Chrysanthemum cinerariiflorum*) SEBAGAI ANTIKANKER
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA (OSCC) TERHADAP
KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR –ALPHA (TNF- α)
SECARA IN VIVO**

SKRIPSI

Diajukan kepada :

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Universitas Islam Negeri

Maulana Malik Ibrahim Malang

Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)

Oleh :

AL MAZIDA FAUZIL AISHAQEENA

NIM. 17910002

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KRISAN
(*Chrysanthemum cinerariiflorum*) SEBAGAI ANTIKANKER
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA (OSCC) TERHADAP
KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR – ALPHA (TNF- α)
SECARA IN VIVO**

SKRIPSI

Oleh :

AL MAZIDA FAUZIL AISHAQEENA

NIM. 17910002

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:

Tanggal, 11 Juni 2021

Pembimbing I,



drg. Risma Aprinda K., M.Si
NIP. 198210052009122001

Pembimbing II,



drg. Anik Listiyana, M.Biomed
NIP. 198008052009122001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Ana Rahmawati, M.Biomed
NIP. 19741203 200912 2 001

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KRISAN
(*Chrysanthemum cinerariiflorum*) SEBAGAI ANTIKANKER
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA (OSCC) TERHADAP
KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR – ALPHA (TNF- α)
SECARA IN VIVO**

SKRIPSI

Oleh:

AL MAZIDA FAUZIL AISHAQEENA

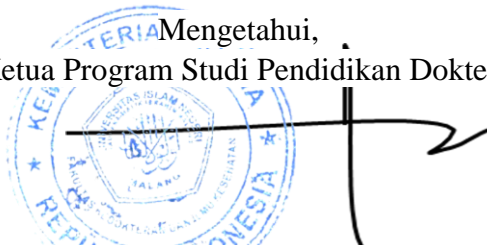
NIM. 17910002

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked):

Tanggal: 11 Juni 2021

Penguji Utama	<u>dr. Sakinah Baraja, Sp. B</u> NIP. 19640420201701012111	
Ketua Penguji	<u>drg. Anik Listiyana, M.Biomed</u> NIP. 198008052009122001	
Sekretaris Penguji	<u>drg. Risma Aprinda K, M.Si</u> NIP. 198210052009122001	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Ana Rahmawati, M.Biomed
NIP. 19741203 200912 2 001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Al Mazida Fauzil Aishaqeena

NIM : 17910002

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 28 Juni 2021

Yang membuat pernyataan



Al Mazida Fauzil Aishaqeena

NIM. 17910002

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan studi di Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Selanjutnya saya haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. DR. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dekan kami tercinta, Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Probowowati Wadjib, M.Kes, Sp. Rad (K)
3. dr. Ana Rahmawati, M.Biomed, selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. dr. Sakinah Baraja, Sp. B sebagai penguji yang sudah memberikan masukan, saran dan nasihat sehingga penulis dapat menyempurnakan naskah skripsi ini.
5. drg. Risma Aprinda K., M.Si sebagai pembimbing 1 dan sebagai dosen Pembimbing Akademik, dan drg. Anik Listiyana, M.Biomed sebagai pembimbing 2 yang telah banyak memberikan perhatian, pengarahan dan pengalaman yang berharga.
6. Segenap sivitas akademika Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen, terima kasih atas segenap ilmu dan bimbingannya selama masa pendidikan.
7. Ayah dan Mama tercinta yang senantiasa mendedikasikan dan mengerahkan seluruh tenaga, doa, restu, motivasi, dan semangat kepada penulis dalam menuntut ilmu, dan dalam meraih cita-cita, dan mendukung dengan penuh seluruh keputusan penulis dalam berbagai hal.

8. Rizkia Milladina Hidayatulloh, Anggun Putri Maulana Ahmad, dan Nadya Dharmayanti selaku sahabat seperjuangan dalam penelitian skripsi yang saling memberi dukungan dan semangat
9. Ektina Naura Barbara Ulfa, Fahriza Abid Sonia, Aslin Nur Ainiyah, Mahya Nailul Azizah, Nur Iedha Tertiana, Nabila Avliyatul Faizah, An'im Fatahna, Awwalatun Nur Khoiriah, Dwiana Galuh Chandra Kirana, Dina Absharina Wulandari, Husnul Khatimah, Luthfia Asyda, Sulistya Maharani, yang selalu menyediakan telinga dan tempat untuk berkeluh-kesah, memberi semangat dan nasihat dalam suka maupun duka, membantu menemani dalam pengamatan maupun dalam pengerjaan skripsi, dan memberi warna dalam setiap hari-hari penulis sehingga penulis bisa sampai dititik ini.
10. Teman-teman claustrum angkatan 2017 yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang senantiasa membantu, memberi dukungan dan semangat selama proses pengerjaan skripsi ini
11. Min Yoongi, Kim Taehyung, Jeon Jungkook, Kim Namjoon, Park Jimin, Kim Seokjin, Jung Hoseok, yang sudah menemani penulis selama masa pendidikan dan dalam menyusun skripsi ini.
12. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.
13. *Last but not least, I wanna thank me, for believing in me, for doing all this hard work, for having no days off, for never quittin', for just being me at all the time.*

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca dan khususnya bagi penulis secara pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 20 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	xiv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian.....	9
1.3.1 Tujuan umum.....	9
1.3.2 Tujuan khusus.....	9
1.4 Manfaat Penelitian.....	9
1.4.1. Manfaat untuk peneliti	9
1.4.2. Manfaat untuk peneliti lain	9
1.4.3. Manfaat untuk masyarakat umum.....	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Karsinoma Oral Sel Skuamosa.....	11
2.1.1 Definisi.....	11
2.1.2 Epidemiologi	11
2.1.3 Etiologi dan Faktor Resiko.....	12
2.2 <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	13
2.2.1. Taksonomi.....	13
2.3 <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i> (TNF- α).....	14
2.4 Kerangka teori	15

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep penelitian	16
3.2. Hipotesis penelitian.....	16

BAB IV METODE

4.1 Desain Penelitian	17
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	17
4.2.1 Tempat Penelitian	17
4.2.2 Waktu Penelitian.....	17
4.3 Populasi Penelitian	17
4.4 Sampel Penelitian	17
4.4.1. Kriteria inklusi.....	19
4.4.2. Kriteria eksklusi.....	19
4.5 Identifikasi variabel penelitian	19
4.6 Definisi operasional.....	20
4.7 Alat dan bahan.....	20
4.7.1. Alat.....	20
4.7.2. Bahan.....	21
4.8 Prosedur penelitian	22
4.8.1. Persiapan hewan coba	22
4.8.2. Pembuatan Na-CMC 0,5%	22
4.8.3. Pembuatan ekstrak daun krisan	23
4.8.4. Perlakuan pada hewan coba	23
4.8.5. Pengukuran kadar TNF- α menggunakan Imunohistokimia	24
4.9 Alur penelitian.....	25
4.10 Analisis data	26

BAB V HASIL

5.1. Hasil Pengukuran Kadar TNF- α	29
---	----

BAB VI PEMBAHASAN

6.1. Pengaruh Pemberian Induksi DMBA terhadap hewan coba	33
--	----

6.3. Kajian Integrasi Islam Dalam Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Krisan (<i>Chrysanthemum cinerariiflorum</i>) terhadap Kadar TNF- α pada Tikus yang Diinduksi DMBA	34
---	----

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan.....	35
6.2. Saran	35

DAFTAR PUSTAKA	36
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	45
----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Stadium OSCC.....	11
Tabel 5.1 Rata Rata berat badan hewan coba selama penelitian.....	21
Tabel 5.2 Hasil Penghitungan kadar TNF- α	21
Tabel 5.3. Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	22
Tabel 5.4 Uji Homogenitas dengan uji <i>Levene</i>	23
Tabel 5.5 Hasil Uji Beda pengaruh menggunakan uji <i>One Way ANOVA</i>	Error!
	Bookmark not defined.4
Tabel 5.6 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	Error! Bookmark not defined.25
Tabel 5.7 Hasil Uji Korelasi <i>bivariate Pearson</i>	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Tumor Necrosis Factor</i> Reseptor 2 (TNFR2)	14
Gambar 5.1 Lidah Tikus yang diterminasi.....	30
Gambar 5.2 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok kontrol positif dengan perbesaran 400x.....	30
Gambar 5.3 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok kontrol negatif dengan perbesaran 400x.....	31
Gambar 5.4 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok perlakuan dosis 1 dengan perbesaran 400x.....	31
Gambar 5.5 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok perlakuan dosis 2 dengan perbesaran 400x.....	32
Gambar 5.6 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok perlakuan dosis 3 dengan perbesaran 400x.....	32
Gambar 5.7. Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Krisan (<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>) Terhadap kadar TNF- α	33
Gambar 5.8 Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Krisan (<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>) Terhadap kadar TNF- α berdasarkan notasi. ... Error! Bookmark not defined.	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Penghitungan Dosis dicampur dengan Na CMC	45
Lampiran 2. Keterangan <i>Ethical Clearance</i>	48
Lampiran 3. Surat Determinasi Daun Krisan	49
Lampiran 4. Berat Badan Tikus Selama Perlakuan	50
Lampiran 5. Hasil Pengukuran Kadar TNF- α	50
Lampiran 6. Analisis Statistik Pemberian Ekstrak Daun Krisan (<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>) terhadap Kadar TNF- α pada Tikus yang Diinduksi DMBA.....	55
Lampiran 7. Dokumentasi	59

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Singkatan	Keterangan
μm	: mikrometer
5- ALA	: <i>5-aminolevulinic acid</i>
Bcl	: <i>B-Cell lymphoma</i>
BCR	: <i>B Cell Receptor</i>
CCND1	: protein <i>Cyclin D1</i>
CDK-inhibitor	: <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i>
Cm	: Sentimeter
C-myc	: <i>MYC Proto-Oncogene</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
DAMP	: <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
DLS	: Diseksi leher selektif
DMBA	: 7,12-dimetilbenz[a]antrase
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
E2F	: Faktor transkripsi
EBV	: <i>Epstein-barr Virus</i>
EGFR	: <i>epidermal growth factor receptor</i>
Gen Rb	: Gen Retinoblastoma
H ₂ O ₂	: Peroksida
HPV-16	: <i>human papillomavirus-16</i>
IHK	: Imunohistokimia
IKK/JNK	: <i>inhibitor kappa kinase / c-Jun amino-terminal kinase</i>
IL	: Interleukin
KgBB	: Kilogram berat badan
LOH	: <i>Loss of Heterozygosity</i>
M	: meter
MAPK/JNK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase</i>
mg	: miligram

ml	: milliliter
MMPs	: <i>metalloproteinase matriks</i>
MRI	: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
Na-CMC	: Natrium karboksimetil selulosa
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor-Kappa Beta</i>
OSCC	: <i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>
P	: Level signifikansi
P53	: gen P53, <i>Suppresor tumor</i>
PA	: Patologi Anatomi
PAMP	: <i>Danger –associated molecular pattern</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCM	: <i>paracoccidioidomycosis</i>
PI3K	: <i>protein kinase B (Akt) fosfatidylinositida 3-kinase</i>
protoporphyrin IX	: Porphin
PRRs	: <i>pattern recognition receptors</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SPSS	: <i>Statistical Product and Service Solutions</i>
TCR	: <i>T Cell Receptor</i>
TGF- α	: <i>Transforming Growth Factors</i>
Th-1	: <i>T Helper-1</i>
TNF- α .	: <i>Tumor Necrosis Factor- alpha</i>
TNFR1	: <i>Tumor Necrosis Factor Reseptor-1</i>
TNFR2	: <i>Tumor Necrosis Factor Reseptor-2</i>
UAE	: <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>
VEGF	: <i>Vascular Endotel Growth Factor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

ABSTRAK

Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) sebagai Antikanker *Oral Squamous Cell Carcinoma* (OSCC) terhadap Kadar *Tumor Necrosis Factor – Alpha* (TNF- α) secara *in Vivo*

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) merupakan tumor ganas, yang mampu berinfiltrasi, berasal dari jaringan epitel, dan dapat dicetuskan oleh karsinogen yang dapat menyebabkan adanya mutasi somatik DNA sehingga akan meningkatkan kadar sitokin pro-inflamasi salah satunya TNF- α , *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) dapat meningkatkan progresifitas dan perburukan pada OSCC. Daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) mengandung senyawa terpenoid dan flavonoid yang memiliki aktivitas anti-inflamasi, modulasi enzim ROS, induksi apoptosis, *autophagy*, menekan proliferasi dan invasi sel kanker, sehingga diharapkan ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dapat menurunkan kadar TNF- α untuk mencegah progresifitas dan perburukan OSCC. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ekstrak daun krisan dalam menurunkan kadar TNF- α pada OSCC. Penelitian ini dilakukan pada tikus *Sprague Dawley* jantan yang diinduksi DMBA 0,5% dan dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol positif yang diinduksi DMBA tanpa diberi terapi ekstrak, kontrol negatif tanpa induksi DMBA dan tanpa pemberian ekstrak daun krisan, lalu kelompok perlakuan yang diinduksi dengan DMBA lalu diberi terapi ekstrak daun krisan yang dibagi menjadi 3 yaitu kelompok dosis 1 (50 mg/KgBB), dosis 2 (100 mg/KgBB), dosis 3 (200 mg/KgBB). Ekspresi TNF- α didapatkan dengan melakukan pengecatan imunohistokimia, selanjutnya TNF- α yang terekspresi diamati menggunakan mikroskop dan dihitung jumlahnya pada masing-masing kelompok. Hasil pengamatan dan penelitian menunjukkan bahwa kadar TNF- α a pada kelompok kontrol positif yaitu dengan rata-rata 56,75, pada kelompok kontrol negatif yaitu 9,65, kelompok perlakuan dosis 1 yaitu 45,125, kelompok perlakuan dosis 2 25,025 dan kelompok dosis 3 yaitu 16,4, kemudian kadar TNF- α diuji menggunakan *One Way ANOVA* yang menunjukkan hasil signifikan ($p < 0,05$), dengan uji *Post Hoc Tukey* menunjukkan hasil berbeda signifikan antar kelompok. Berdasarkan hasil tersebut disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun krisan dapat menurunkan kadar TNF- α pada OSCC.

Kata kunci: OSCC, daun krisan, TNF- α

ABSTRACT

Effect of Chrysanthemum Leaf Extract (*Chrysanthemum cinerariifolium*) as Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Anticancer on Tumor Necrosis Factor - Alpha (TNF- α) Levels in Vivo

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is a malignant tumor, capable to infiltrating to another organs, came from epithelial tissue, which can be triggered by carcinogens that can cause somatic DNA mutations that will increase levels of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , TNF- α may increase progression and worsening of OSCC. Chrysanthemum leaves (*Chrysanthemum cinerariifolium*) contain Terpenoid and Flavonoid compounds which have anti-inflammatory activity, modulation of ROS enzymes, induction of apoptosis, autophagy, suppressing proliferation and invasion of cancer cells, so it's hoped that chrysanthemum leaf extract (*Chrysanthemum cinerariifolium*) can reduce TNF- α levels for prevent progression and worsening of OSCC. The purpose of this study was to determine the effect of chrysanthemum leaf extract to decrease TNF- α expression in OSCC. This research was conducted on male Sprague Dawley rats induced by DMBA 0,5% which were divided into 5 groups, there is positive control group induced by DMBA without chrysanthemum leaf extract therapy, negative control group without DMBA induction and without chrysanthemum leaf extract therapy, Then treatment group that was induced by DMBA and given chrysanthemum leaf extract for therapy which was divided into 3 group, there is dose group 1 (50 mg / KgBB), dose group 2 (100 mg / KgBB), dose group 3 (200 mg / KgBB). TNF- α expression was obtained by imunohistochemical staining, then the TNF- α expression was observed using a microscope and the amount in each group was counted by cuonter. The results on observations and research showed that the levels of TNF-a in positive control group average is 56,75, and negative control group was 9,65, then the treatment group dose 1 was 45,125, the treatment group dose 2 was 25,025 and the dose group 3 was 16,4 , then TNF- α levels were tested using One Way ANOVA which showed significant results ($p < 0,05$), and significantly different between groups with Post Hoc Tukey's test. Based on these results, it was concluded that Chrysanthemum leaf extract can decrease TNF- α levels in OSCC.

Key word : OSCC, extract Chrysanthemum Leaves, TNF- α

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit dengan karakteristik adanya pertumbuhan sel yang abnormal. Kanker dapat menyebar dan menyebabkan kematian apabila pertumbuhan sel abnormal tidak terkontrol (*American Cancer Society*, 2020). Pada tahun 2018 penderita kanker mencapai 18,1 juta, dan 9,6 juta kematian dari 185 negara dengan 36 tipe kanker (WHO, 2018). Pada tahun 2020, diperkirakan adanya kasus baru sekitar 52.260 dan kematian sekitar 10.750 pasien, dengan 17.660 dari 52.260 adalah kanker pada lidah, dan estimasi kematian sebesar 2.830 pasien (*American Cancer Society*, 2020). Di Indonesia, pada tahun 2018 terdapat 5.078 kasus baru, dengan 2.326 kematian, dan prevalensi selama 5 tahun sebesar 12.669 insiden (WHO, 2018). Karsinoma pada lidah dengan jenis *Oral Squamous Cell Carcinoma* (OSCC) merupakan karsinoma mulut tersering dengan presentase hampir mencapai 95% (Soepardi EA *et.al.*, 2007).

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) merupakan tumor ganas yang berasal dari jaringan epitel yang mampu berinfiltrasi melalui aliran darah dan aliran limfatik dan dapat menyebar ke seluruh tubuh. (Warshawky S, 2006). OSCC merupakan jenis karsinoma mulut yang paling sering terjadi, dengan sekitar 90-95% dari total keganasan pada rongga mulut. Lokasi OSCC terletak pada lidah (ventral dan lateral), *retromolar*, dasar mulut, mukosa *buccal*, dan bibir (King RJ, 2006). OSCC memiliki etiologi multifaktorial, yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti konsumsi tembakau, alkohol, infeksi sifilis, paparan sinar matahari, radiasi,

fenol, virus, malnutrisi dan anemia defisiensi besi, dan melibatkan faktor genetik yang mengalami kelainan dan mutasi (Syad *et al.*, 2015, Driemel *et al.*, 2017)

Onkogen merupakan gen seluler yang secara normalnya mengatur perkembangan sel kanker. Onkogen memiliki peran kritis dalam tumor yang berfungsi sebagai *growth factor*, *growth factor receptors*, dan sinyal transduksi. Onkogen sangat berhubungan dengan proto-onkogen, namun memerlukan mutasi untuk memproduksi onkogen yang abnormal, atau suatu kontrol mekanisme yang memungkinkan terjadinya perubahan ekspresi gen, sehingga onkogen dapat kehilangan aktivitas normalnya. Pada OSCC, diketahui bahwa proto-onkogen dapat aktif karena adanya mutasi, hal ini serupa dengan kanker kolon, dan payudara (Mei S, 2008)

Adanya mutasi menyebabkan beberapa gangguan dan gejala, beberapa bahaya pada OSCC adalah stadium awal yang tidak terdeteksi, tidak nyeri kemudian berkembang menjadi nyeri dengan sensasi terbakar. Beberapa OSCC timbul dengan gambaran mukosa normal, namun beberapa didahului gambaran lesi pre-malignan seperti eritroplakia dan leukoplakia. Gejala OSCC ditunjukkan sebagai ulkus dengan pinggir lesi pecah-pecah atau peninggian pinggiran lesi. Lesi dapat berupa benjolan, lesi kemerahan (eritroplakia), lesi berwarna putih, atau campuran lesi kemerahan dan lesi putih. Lesi dapat berupa soket ekstraksi yang tidak sembuh, atau pembesaran nodus limfatikus servikal (Anastasios K, 2012). Penentuan ukuran dan batas tumor dapat dilakukan dengan pemeriksaan *CT Scan* dan MRI. Pada pemeriksaan histopatologi didapatkan proliferasi sel yang tampak invasif (berbentuk iregular dan *epitelium lesional* menuju ke jaringan ikat subepitel) yang menyebar ke jaringan lain seperti otot, tulang atau jaringan adiposa. Selain itu,

ditemukan adanya sel epitel lesional yang dapat membentuk pembuluh darah yang disebut angiogenesis, biasanya terlihat hiperkromatik dan memproduksi *keratin pearls* sehingga sel akan mengalami keratinasi (Damm. *Et. Al.*2002). Adanya peradangan pada OSCC mempengaruhi konsentrasi *Tumor Necrosis Factors-alpha* (TNF- α) hal ini dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan Juretic (2012) dan Krishnan (2014) dimana ditemukan bahwa konsentrasi (TNF- α) lebih meningkat pada kondisi OSCC dibanding pada kondisi lesi pre-malignan (Juretic *et al.*, 2012, Krishnan *et al.*, 2014).

Tumor Necrosis Factors-alpha (TNF- α) merupakan mediator yang memproduksi sel imun, non-imun, dan sel tumor (Abul K *et al.*, 2003). Adanya inflamasi kronik dapat mendorong terjadinya pertumbuhan dan progresifitas kanker. Selain itu TNF- α sebagai sitokin pro-inflamasi juga dapat berperan dalam menghubungkan inflamasi dan karsinogenesis (Xia Wang, 2008). Efek kanker pada TNF dimediasi melalui 2 reseptor yang berbeda, TNFR1 dan TNFR2, efek pada TNFR2 dapat merangsang aktivasi, migrasi, dan proliferasi sel (Mercogliano, 2020). Diketahui bahwa TNF- α memiliki sensitifitas 100% dan 96,7% spesifitas pada karsinoma oral, sehingga TNF- α dapat digunakan sebagai biomarker pada OSCC (Deepthi G *et al.*, 2019). Sehingga penelitian ini menggunakan TNF- α sebagai biomarker sitokin OSCC.

Tumor Necrosis Factors-alpha (TNF- α) memiliki peran dalam perkembangan tumor dalam berbagai tahap karsinogenesis. TNF- α merangsang transisi epitel mesenkim yang diinduksi TGF- α dan juga menginduksi sekresi *Vascular Endotel Growth Factors* (VEGF) oleh fibroblas dan mendorong angiogenesis, yang memainkan peran dalam mendorong persinyalan NF- κ B,

pathway yang menentukan dalam mendorong metastasis (Landskron G *et al.*, 2014). Sitokin seperti TNF- α dengan aktivitas pro-inflamasi, pro-angiogenik, dan imunoregulatori yang diproduksi oleh OSCC, menjadi bagian dari tumor lokal dan berkontribusi pada perkembangan OSCC, TNF- α sebagai sitokin pro-inflamasi, juga dapat digunakan untuk membantu menegakkan diagnostik pada OSCC, dan banyak terkandung pada saliva (Rhodus.*et. al.*2005).

Terdapat beberapa terapi untuk OSCC, yaitu glosektomi total (pengambilan seluruh jaringan pada lidah), *Pull Through Operation*, *Commando Jaw-Neck Resesction*, *Jaw – Tongue – Neck resection*, terapi ini didasarkan pada stadium dan invasi kanker (Ganly, *et. Al.* 2009). Selain pembedahan, terapi OSCC dapat dilakukan dengan radioterapi, menggunakan radiasi baik radiasi internal maupun eksternal, dan dapat dikombinasikan bersama pembedahan dengan hasil bahwa radioterapi lebih memberi hasil maksimal pada karsinoma stadium III dan IV. Selain itu, dapat digunakan kemoterapi sebagai terapi paliatif (Zhumig G, Quan Z, 2008)

Radioterapi *preoperative* sebelum adanya tindakan pembedahan pada kanker ini memiliki beberapa keuntungan dan kelemahan, keuntungannya yaitu radioterapi *preoperative* ini menyebabkan pinggiran lesi kanker menjadi inaktif, sklerosis, menyumbat saluran limfe dan mengurangi distribusi sel saat dilakukan pembedahan. Namun memiliki kekurangan yaitu dalam hal penyembuhan luka pasca pembedahan, dan dapat menyebabkan ruptur vaskuler. Oleh karena itu dimodifikasi beberapa perubahan, yaitu radioterapi diberikan setelah pembedahan, namun hal ini beresiko tidak memiliki efektifitas radioterapi apabila terlambat dalam pemberian (Teuku Husni, T.R. 2009). Maka dari itu penting adanya suatu

tindakan preventif untuk mencegah adanya OSCC maupun mencegah terjadinya komplikasi penyakit maupun komplikasi terapi.

Pada terapi sintetik, penggunaan kemoterapi memiliki beberapa efek samping, seperti rambut rontok, mual muntah, sariawan, gangguan tidur, peningkatan berat badan, kesemutan dan lain-lain, hal ini dikarenakan kemoterapi yang tidak hanya menghancurkan sel-sel kanker, namun juga menyerang sel non-kanker (Noorwati, S. 2007). Oleh karena itu, disarankan penggunaan obat tradisional yang dinilai lebih aman, dan memiliki efek samping rendah. Selain itu, obat-obatan tradisional juga dinilai mudah didapat, murah dan dapat digunakan oleh setiap orang (Ningsih, 2016). Salah satu tanaman yang memiliki berbagai macam khasiat obat adalah tanaman krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*), yang termasuk dalam *family asteraceae*. Tanaman krisan memiliki banyak spesies, salah satu spesies tanaman krisan yang sering digunakan sebagai obat adalah *Chrysanthemum cinerariifolium*. (Kalia *et al.*, 2016). Tanaman krisan atau *Chrysanthemum cinerariifolium* memiliki bunga berwarna putih, dengan pucuk di tengah berwarna kuning, memiliki daun berwarna hijau dan dapat tumbuh sekitar 40-100 cm (Elliott, 2007).

Daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) memiliki efek sebagai obat antibakteri, anti-inflamasi, alergi dan anti-kanker (Grdisa *et al.*, 2009). Beberapa studi terdahulu menunjukkan bahwa daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) mengandung terpenoid, flavonoid dan turunannya yang dinilai memiliki aktivitas antikanker dan anti-inflamasi (Ukiya *et al.*, 2002). Pada penelitian Agustina S 2016 bahwa terpenoid dan flavonoid juga terkandung dalam beberapa tanaman seperti rimpang pada jahe (*Zingiber officinale*), rimpang kunyit

(*Curcuma longa* Linn), rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*), namun juga banyak tanaman yang mengandung flavonoid namun tidak mengandung terpenoid seperti daun pada sirsak (*Annona muricata* L), daun jambu biji (*Psidium guajava*), dan kulit buah delima (*Punica granatum*) (Agustina S, 2016). Sehingga dalam penelitian ini digunakan daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) yang telah dibuktikan mengandung flavonoid dan terpenoid yang memiliki efek anti inflamasi, antikanker, dan antiproliferasi (Listiyana A, 2019)

Beberapa studi juga melaporkan bahwa daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) juga memiliki kandungan quercetin (Alviana *et al.*, 2016). Kandungan quercetin dianggap memiliki efek sebagai antikanker melalui induksi gen P21 yang merupakan *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor* (CDK inhibitor) yang memiliki fungsi dalam menghambat siklus sel, seiring dengan penurunan dalam gen Rb (*Tumor Suppressor gene*) yang menghambat siklus sel di fase G1/S dengan menghambat E2F (faktor transkripsi gen) (Yerlikaya *et al.*, 2017). Menurut hasil penelitian Muti'ah 2020, bahwa peningkatan apoptosis pada ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) diduga karena kandungan flavonoid yang menginduksi apoptosis melalui kerusakan DNA secara *irreversible*, dan apoptosis melalui *pathway* P53 (Mutiah R, 2020). Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) yang diketahui memiliki efek antikanker dalam menurunkan kadar TNF- α .

Menurut penelitian Madhavan P, 2006, quercetin yang merupakan golongan flavonoid dapat menurunkan produksi TNF- α endogen, yang berarti bahwa flavonoid memiliki kapasitas untuk memodulasi respon imun dan memiliki aktivitas anti-inflamasi. (Madhavan P *et al.*, 2006).

Sebagai manusia, kita memiliki kemampuan untuk mencegah penyakit, salah satunya karsinoma pada kavitas oral, oleh karena itu pentingnya menjaga kebersihan mulut dan mengurangi paparan rokok akan mengurangi resiko terjadinya penyakit mulut salah satunya caranya adalah membersihkan mulut utamanya menggunakan siwak, hal ini disebutkan dalam Hadits Riwayat Imam Ibnu Majah:

وقال صلى الله عليه وسلم: { تَسَوَّكُوا فَإِنَّ السَّوَّاکَ مَطْهَرَةٌ لِلْفَمِ مَرْضَاةٌ لِلرَّبِّ }
(رواه ابن ماجة)

Yang artinya: *bersiwaklah kalian, karena sungguh siwak itu mensucikan mulut dan diridhai Tuhan (HR. Ibnu Majah)*

Dari hadits itu Nabi Muhammad SAW menekankan untuk menjaga kebersihan mulut sebagai bentuk pencegahan penyakit mulut salah satunya OSCC dengan menggunakan siwak, dimana suci itu adalah bersih. Selain itu, penggunaan pengobatan herbal sudah dilakukan sejak masa Rasulullah SAW, seperti madu, jahe, lidah buaya dan sebagainya sebagai bentuk upaya menjaga kesehatan pada masa itu, seperti disebutkan pada Surat An-Nahl ayat 69:

ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا ۚ يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ
أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ ۚ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (انهل: ٦٩)

Yang artinya : *Kemudian makanlah dari tiap-tiap (macam) buah-buahan dan tempuhlah jalan Tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu). Dari perut lebah itu ke luar minuman (madu) yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Tuhan) bagi orang-orang yang memikirkan (An Nahl:69).*

Dalam ayat ini menjelaskan bahwa penggunaan obat herbal sudah dilakukan pada zaman Rasulullah SAW. Dalam tanaman terdapat senyawa yang berfungsi sebagai obat sehingga dapat menyembuhkan penyakit pada manusia dan pengobatan ini dianjurkan oleh Rasulullah SAW

Atas dasar latar belakang diatas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang pengaruh antikanker menggunakan daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) pada OSCC dalam menurunkan ekspresi TNF- α pada hewan coba yang diinduksi DMBA.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dapat menurunkan kadar TNF- α pada OSCC?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) terhadap kadar TNF- α pada OSCC

1.3.2 Tujuan khusus

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun (*Chrysanthemum cinerariifolium*) terhadap jumlah TNF- α yang terekspresi pada jaringan lidah hewan coba yang diinduksi DMBA

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat untuk peneliti

1. Menambah wawasan dan motivasi untuk bahan pembelajaran peneliti kedepannya
2. Menambah pengalaman bagi peneliti dalam menerapkan ilmu yang didapatkan selama masa pendidikan.

1.4.2. Manfaat untuk peneliti lain

1. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pemberian ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dalam menurunkan kadar TNF- α pada OSCC
2. Penelitian ini diharapkan dapat menambah kajian ilmiah tentang pemanfaatan daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) untuk terapi tradisional OSCC

3. Penelitian ini dapat menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya terkait pengaruh ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) terhadap kadar TNF- α pada OSCC

1.4.3. Manfaat untuk masyarakat umum

1. Memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemanfaatan daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif obat alami antikanker pada OSCC.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma Oral Sel Skuamosa

2.1.1 Definisi

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) merupakan neoplasma maligna yang berasal dari sel keratin epidermis dan epitel skuamosa. Karsinoma ini dapat tumbuh secara primer ataupun metastasis (Gunawan *et al.*, 2020). OSCC bersifat invasif pada epitel rongga mulut dengan berbagai tingkat diferensiasi, dan dapat terjadi pada semua rongga mulut, lidah, dasar mulut, palatum, mukosa *buccal*, dan gingiva (Rehulina G *et al.*, 2015)

OSCC merupakan keganasan non-melanoma terbanyak kedua, dan merupakan jenis karsinoma terbanyak untuk jenis kanker mulut dengan presentase sekitar 90% dari seluruh jenis karsinoma oral (Gunawan *et al.*, 2020, Naggari A. 2017). OSCC ini merupakan neoplasma yang invasif berdasarkan tingkatan diferensiasi. OSCC juga cenderung untuk dapat meluas dan metastase (Rehulina *et al.*, 2015). Karsinoma ini memiliki sifat melemahkan juga merusak bentuk dan berakibat cacat (Warnakulasuriya, 2009)

2.1.2 Epidemiologi

Kanker merupakan penyebab mortalitas dan morbiditas lebih dari 10 juta kasus baru dan lebih dari 6 juta kematian setiap tahun di dunia (Lu R *et al.*, 2011). OSCC ini merupakan keganasan tersering ke-6 diantara keganasan lainnya, dengan prevalensi lebih dari 600.000 pertahun (Giovannacci *et al.*, 2016). OSCC merupakan jenis karsinoma mulut yang paling sering terjadi, yaitu sekitar 90-95%

dari total keganasan pada rongga mulut lainnya. Lokasi OSCC terletak pada lidah (ventral, lateral), retromolar, dasar mulut, mukosa *buccal*, dan bibir (King RJ, 2006)

WHO memperkirakan bahwa 43% OSCC terjadi akibat penggunaan tembakau, konsumsi alkohol, diet dan gaya hidup tidak sehat, dan infeksi (Petersen PE, 2009). Di Indonesia, 2-5% karsinoma dari seluruh keganasan merupakan karsinoma pada rongga mulut, dan pada tahun 2012 tercatat 5.329 penderita dan diperkirakan akan meningkat 21,5 % pada tahun 2020 (Sirait A, 2013)

2.1.3 Etiologi dan Faktor Resiko

Terdapat 2 faktor predisposisi yang mendukung terjadinya OSCC, yaitu adanya faktor intrinsik yaitu faktor yang berasal dari genetik, dan faktor ekstrinsik seperti merokok, alkohol, tembakau, malnutrisi, infeksi virus dan trauma kronis (Rehulina *et al.*, 2015)

90% faktor resiko signifikan dalam OSCC adalah konsumsi jangka panjang alkohol dan penggunaan tembakau (Cesar Rivera, 2015). Beberapa etiologi dan faktor resiko dalam OSCC:

a. Tembakau

Rokok dari tembakau mengandung 3 kelompok bahan kimia yaitu, *nitrosamine*, *benzopyrenes* dan *aromatic amine* yang dapat mendorong terjadinya kanker. Perokok memiliki 3 kali resiko yang lebih tinggi dalam perkembangan OSCC dibandingkan dengan yang tidak merokok. Perokok pasif akibat lingkungan yang tidak sehat juga meningkatkan peluang dalam terjadinya OSCC dibandingkan dengan lingkungan yang sehat. Oleh karena itu, merokok tidak hanya menurunkan imunitas kavitas oral, namun juga dapat

menyebabkan gingivitis, periodontitis dan infeksi kronis yang juga dapat mengarah kepada OSCC (Cesar Rivera, 2015).

b. Alkohol

Etanol memiliki berbagai efek negatif bagi organisme. Efek ini dapat secara lokal dengan meningkatkan permeabilitas pada mukosa oral, menghancurkan partikel lipid epitel dan mengarah kepada atrofi epitel secara umum, sehingga mencetuskan dan meningkatkan perburukan OSCC.

Pada level sistemik, etanol memiliki efek mutagenik yang mengarah pada penurunan aliran saliva, penurunan fungsi hepar untuk menguraikan karsinogen kimia dan akhirnya mengarah pada gangguan sistem imun. Gangguan ini meningkatkan resiko infeksi dan meningkatkan pertumbuhan abnormal jaringan (Cesar Rivera. 2015)

c. Lain lain

Faktor risiko lain adalah eksposur sinar UV berkepanjangan, iritasi dalam jangka yang panjang pada membran mukosa oral akibat gigi palsu yang tidak dirawat, obat-obatan imunosupresan, infeksi *human papillomavirus*-16 (HPV-16) atau *Epstein-barr Virus* (EBV), paparan radiasi, dan *lichen planus* yang tidak sembuh (Rivera C, 2015)

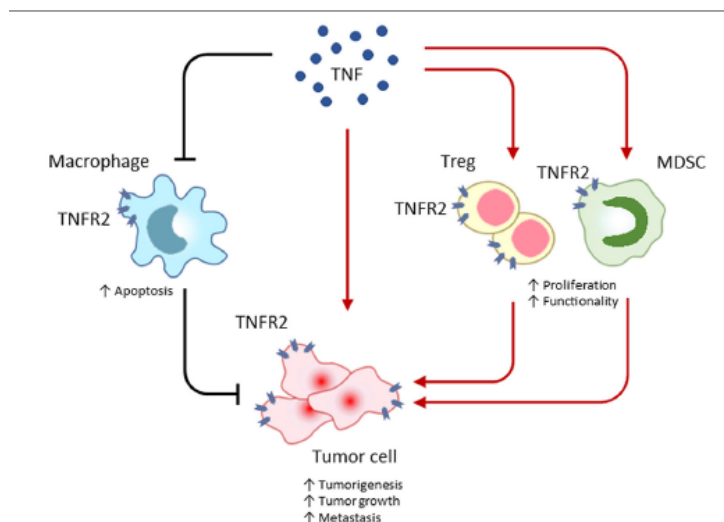
2.2 *Chrysanthemum cinerariifolium*

2.2.1. Taksonomi

Tanaman krisan atau *Pyrethrins* atau *Chrysanthemum cinerariifolium* adalah tanaman yang tumbuh di daerah Kenya yang memiliki bunga berwarna putih, dengan pucuk ditengah berwarna kuning, memiliki daun berwarna hijau dan dapat tumbuh sekitar 40-100 cm (Elliott, 2007)

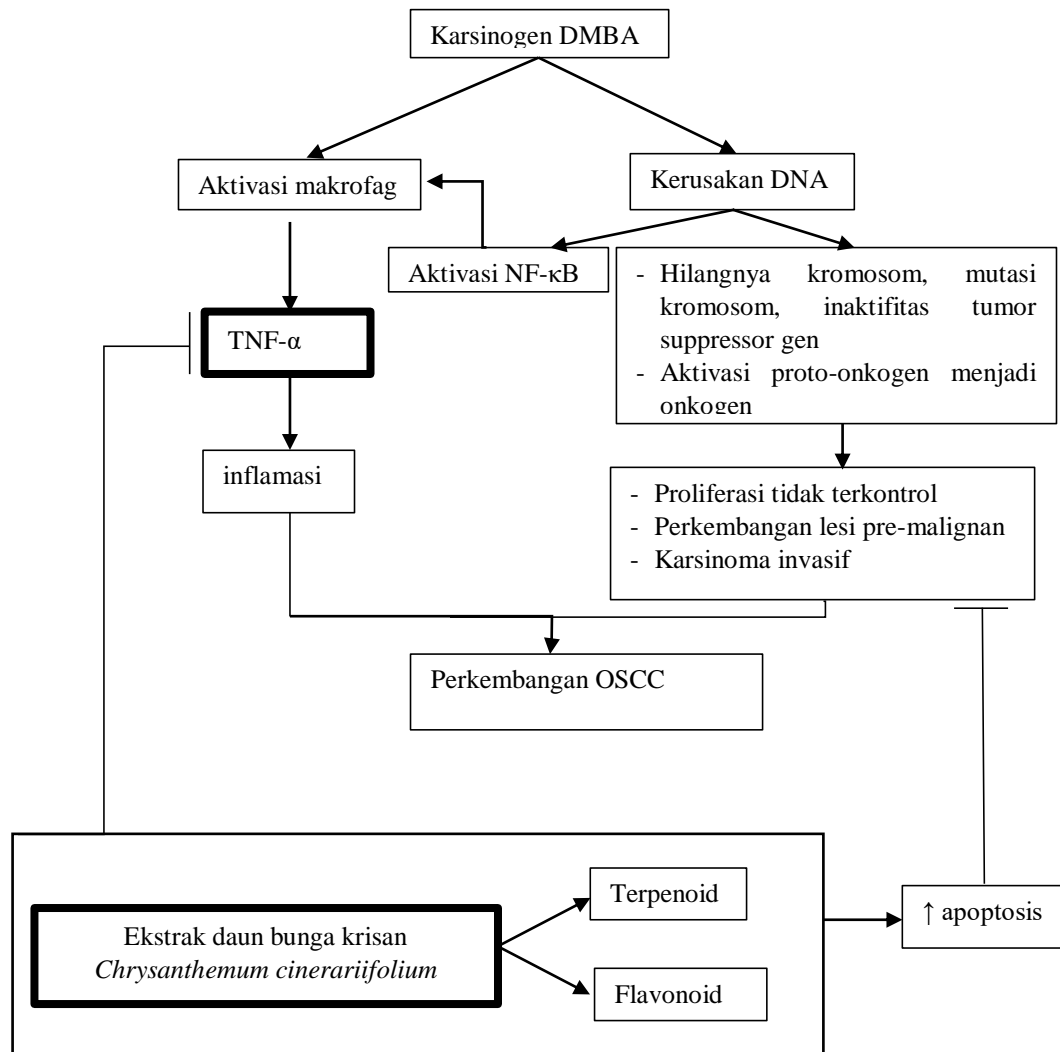
2.3 Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α)

Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) merupakan sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam inflamasi kronik, dan adanya inflamasi kronik berkontribusi dalam mencetuskan kanker (Bradley, 2008). Secara umum sitokin dibedakan menjadi dua kelompok. Satu kelompok terdiri dari faktor pro-inflamasi, termasuk *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), IL1 β , IL-6, dll. Kelompok lainnya terdiri dari faktor anti-inflamasi, termasuk IL-10, IL-13, dll. (BalkWill *et al.*, 2005). Tingkat tinggi sitokin pro-inflamasi meningkatkan pertumbuhan dan migrasi tumor, meningkatkan kelangsungan hidup sel-sel ganas, menekan respons imun adaptif, menyebabkan resistensi terhadap hormon dan agen kemoterapi (Naugler W *et al.*, 2007).



Gambar 2.1 *Tumor Necrosis Factor* Reseptor 2 (TNFR2)
(Yuqiao Sheng *et al.*, 2018)

2.4 Kerangka teori



Keterangan:

Variable yang diteliti :

Variable yang tidak diteliti :

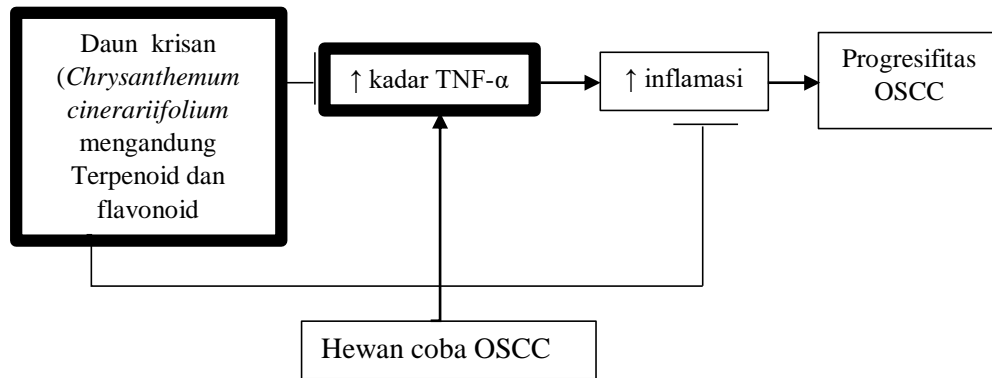
Memicu :

Menghambat :

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep penelitian



Keterangan:

1. Variabel independen : Ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*)
2. Variabel dependen : kadar TNF- α

Ekstrak daun krisan yang mengandung terpenoid dan flavonoid diharapkan dapat menurunkan kadar TNF- α dalam mencegah progresifitas dalam OSCC. Namun dalam perannya, TNF- α sebagai sitokin pro-inflamasi mudah dicetuskan dengan adanya inflamasi atau infeksi lokal maupun sistemik, oleh karena itu, adanya infeksi atau inflamasi pada hewan coba dapat mempengaruhi kadar TNF- α .

3.2. Hipotesis penelitian

H0 : Pemberian ekstrak daun bunga krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) tidak dapat menurunkan kadar TNF- α pada OSCC

H1 : Pemberian ekstrak daun bunga krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dapat menurunkan kadar TNF- α pada OSCC

BAB IV

METODE

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif eksperimental yang dilakukan dilaboratorium dengan rancangan *true eksperimental pos test only control group design* dengan tujuan untuk menganalisis dan membandingkan beberapa kelompok perlakuan. Penelitian ini menggunakan tikus jantan *Sprague Dawley* yang akan dibuat model OSCC dengan diinduksi *12-dimetilbenz[a]antrase* (DMBA).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat, yaitu:

- a. Laboratorium Hewan Coba, Biokimia dan Histologi Program Studi Pendidikan Dokter UIN Maulana Malik Ibrahim
- b. Pemeriksaan Patologi Anatomi dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soetomo Surabaya.
- c. Pemeriksaan imunohistokimia di laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2021 – Mei 2021

4.3 Populasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur *Sprague Dawley* yang berumur 2-3 bulan, dengan berat 150-180 gram.

4.4 Sampel Penelitian

Estimasi besar sampel pada penelitian ini didapatkan menggunakan rumus Federer:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

t = jumlah kelompok penelitian

n = jumlah sampel

apabila t = 5

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/4$$

$$n \geq 3.75 + 1 \rightarrow n \geq 4.75 \sim 5$$

Dari perhitungan rumus tersebut, didapatkan bahwa sampel yang digunakan pada setiap kelompok perlakuan adalah 5, untuk menghindari adanya hewan coba yang mati, menghilang dan lain sebagainya maka dihitung faktor koreksi menggunakan rumus: $(f) \pm 10\%$, besar sampel dikalikan $1/(1-f)$, sehingga didapatkan perhitungan $1/(1-0.1) \times 5 = 5.5 \sim 6$. Didapatkan bahwa sampel setiap kelompok perlakuan adalah 6, dan total sampel dalam penelitian ini adalah 30 hewan coba.

Tikus pada penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok, dengan 3 kelompok perlakuan, kelompok kontrol (+), dan kelompok kontrol (-). Di dalam setiap kelompok akan berisi 6 tikus yang dirandomisasi, 5 kelompok terdiri atas:

1. Kelompok kontrol (-)

Kelompok hewan coba yang tidak diinduksi DMBA

2. Kelompok kontrol (+)

Kelompok hewan coba yang diinduksi DMBA tanpa terapi ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*)

3. Kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan pada penelitian ini merupakan kelompok hewan coba yang diinduksi DMBA dan diberi dosis ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*)

4.4.1. Kriteria inklusi

1. Tikus jantan galur *Sprague Dawley*
2. Berat badan 150 – 180 gram
3. Umur 2 – 3 bulan
4. Sehat
5. Tidak ada kelainan atau penyakit pada rongga mulut

4.4.2. Kriteria eksklusi

1. Sakit
2. Stress

Ditandai dengan imobilitas hewan coba saat diberi rangsangan atau stressor, penurunan higienitas kandang tikus, *grooming* atau apatis pada hewan coba, dan penurunan konsumsi makanan.

3. Mati dan saat penelitian

4.5 Identifikasi variabel penelitian

4.5.1. Variabel dependen

Variabel dependen pada penelitian ini yaitu kadar TNF- α dalam pemeriksaan imunohistokimia yang terdapat pada jaringan epitel lidah dan atau jaringan ikat hewan coba.

4.5.2. Variabel independen

Variabel independen adalah dosis ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariiflorum*) yang diberikan dalam 3 dosis, yaitu 50 mg/KgBB, 100 mg/KgBB, dan 200 mg/KgBB.

4.5.3. Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah tikus jantan galur *Sprague Dawley* yang berumur 2-3 bulan dengan berat 150-180 gram, makanan dan minum.

4.6 Definisi operasional

Definisi operasional (variabel) pada penelitian:

1. Ekstrak daun krisan

Ekstrak daun krisan adalah daun tanaman krisan (*Chrysanthemum cinerariiflorum*) yang dikeringkan lalu diekstraksi dengan menggunakan metode UAE dengan pelarut etanol 96%, dan diberikan pada minggu ke 5 setelah terjadi peradangan akibat induksi DMBA 0,5% dengan cara disonde (menggunakan sonde 1 ml) dengan dosis 50 mg/KgBB, 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB diberikan selama 14 hari.

2. Kadar TNF- α dan Imunohistokimia

Sitokin pro-inflamasi yang dikeluarkan makrofag dan sel kanker yang diamati dari preparat lidah hewan coba dengan metode imunohistokimia yang kadarnya dilihat menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40X, 100X, dan 400X, pada 10 lapang pandang. Kemudian dihitung menggunakan *counter*.

4.7 Alat dan bahan

4.7.1. Alat

a. Pembuatan ekstrak

Alat dalam pembuatan ekstrak dibutuhkan gelas *erlenmeyer*, kertas saring, *evaporator rotary*, dan oven

b. Pembuatan model hewan dan preparasi hewan coba

Alat yang dibutuhkan adalah kandang dengan suhu 28 - 32°C, spuit 3 ml, sonde, pins, gunting bengkok dan gunting lurus

c. Alat terminasi dan diseksi

Papan bedah, *scalpel*, pinset, jarum pentul, gunting bedah, cawan petri, gelas beker.

d. Alat pembuatan preparat

Pisau *scalpel*, pinset, saringan, *tissue casset*, mesin *vacuum*, *freezer* -20°C, mesin *microtome*, *waterbath* 46°C, *object glass*, *cover glass*, rak pewarnaan, oven 60°C

e. Pembuatan preparat imunohistokimia

Blok paraffin, mikrotom, *decloaking chamber* dengan suhu 95°C, mixture chamber, dan inkubator.

f. Pengamatan

Alat yang digunakan adalah mikroskop dengan perbesaran 40X, 100X, dan 400X dan penghitungan kadar TNF- α menggunakan *counter*.

4.7.2. Bahan

a. Pembuatan ekstrak

Bahan untuk membuat ekstrak adalah simplisia ekstrak daun krisan, Na-CMC 50 mg, aquades, etanol 96%.

b. Pembuatan model hewan dan preparasi hewan coba

Bahan untuk mempersiapkan hewan coba adalah DMBA 0,5% 0,1 ml/100gramBB, dan larutan ekstrak yang dilarutkan dengan Na-CMC.

c. Pembuatan preparat imunohistokimia

Bahan dalam pembuatan preparat imunohistokimia adalah buffer formalin 10%, blok paraffin, alkohol, xylol, etanol, H₂O₂ dalam methanol 0,5%, larutan diva, PBS, PAP, *Background sniper*, antibodi primer TNF- α , antibodi sekunder *kit*, TREKAVIDIN-HRP, kromagen DAB, *maeyer haematoxylen*, lithium karbonat jenuh, alkohol 80%, dan entellan

d. Bahan pewarnaan preparat

Pewarna hematoksilin, xilol I dan II, etanol 96%, HCl 0,5%, entellan

e. Bahan terminasi dan diseksi

Formalin 10%, eppendorf, kertas label, wadah organ, *microtube*, tip kuning, jarum injeksi, rak *microtube*.

4.8 Prosedur penelitian

4.8.1. Persiapan hewan coba

1. Hewan coba ditempatkan pada kandang diisi dengan sekam, alas kandang yang dapat terbuat dari serutan kayu, guntingan kertas, ataupun serbuk gergaji, wadah makan dan minum, serta makanan dan minumannya.
2. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok dan dalam 1 kelompok terdiri dari 6 tikus dengan perlakuan yang berbeda di setiap kelompok

4.8.2. Pembuatan Na-CMC 0,5%

1. Timbang serbuk Na CMC sebanyak 50 mg

2. Tuangkan ke dalam aquades panas
3. Lalu biarkan hingga 15 menit sampai menyerupai jel dan berwarna bening
4. Jel yang terbentuk diaduk sampai menjadi masa yang homogen
5. Lalu jel yang homogen diencerkan dengan aquades hingga volume mencapai 100 ml
6. Sediaan yang telah siap disimpan dalam lemari pendingin

4.8.3. Pembuatan ekstrak daun krisan

Ekstraksi merupakan proses untuk menarik kandungan kimia yang terlarut dari suatu serbuk simplisia, dan akan terpisah dengan bahan yang tidak larut (Depkes RI, 2006).

1. Ekstrak daun krisan dibuat dengan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE), metode UAE adalah proses ekstraksi yang dibantu oleh gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20 - 20.000 kHz. Proses ekstraksi dengan metode ini memecah dinding dengan getaran ultrasonik sehingga kandungan didalamnya mudah keluar. Metode ini yang dikombinasikan dengan pelarut organik dapat mempercepat proses ekstraksi (Sholihah M. 2017).

4.8.4. Perlakuan pada hewan coba

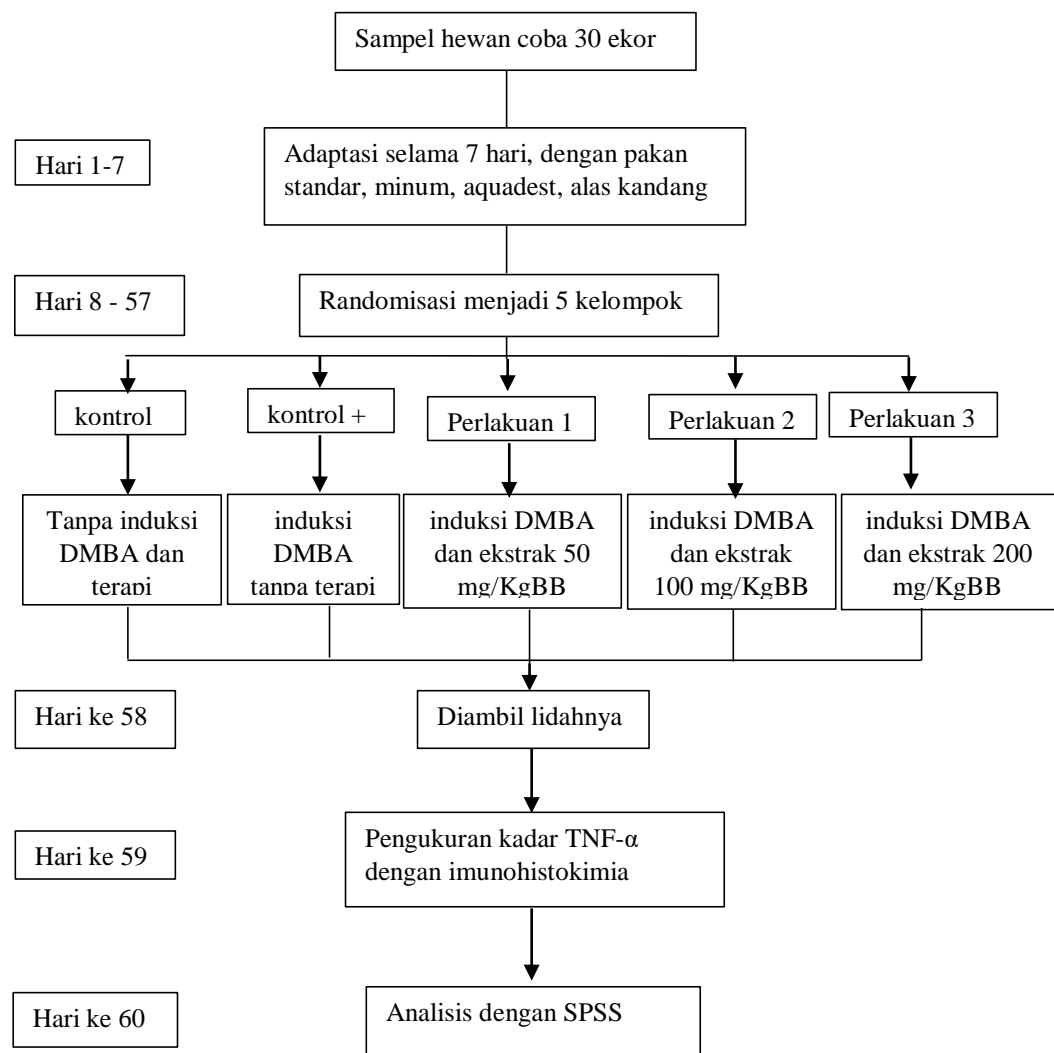
Model hewan OSCC menggunakan Tikus galur *Sprague Dawley* yang dikenal mudah ditangani dikarenakan tenang dan jinak. Tikus galur ini sering digunakan dalam banyak penelitian, seperti uji keamanan, uji toksikologi, uji nutrisi atau uji farmakologi lainnya. Tikus diinduksi kanker dengan injeksi DMBA 0,5%

0,1 ml/100gramBB di bagian lateral lidah dan ditunggu selama 5 minggu.
(Meiyanto, 2007)

4.8.5. Pengukuran kadar TNF- α menggunakan Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah metode dengan tujuan untuk identifikasi sel spesifik berdasarkan komponen yang berikatan antara antibodi dan antigen (Yani C *et al.*, 2004). Penelitian ini menggunakan imunohistokimia TNF- α

4.9 Alur penelitian



NB:

Pada hari ke 8-57 dibagi menjadi

- Induksi DMBA 0,5% 0.1 ml/100gramBB lalu ditunggu 5 minggu, dan dilihat apakah ada peradangan atau tanda pre-malignan
- Dan setelahnya di sonde ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariiflorum*) selama 2 minggu

4.10 Analisis data

Data hasil ekspresi TNF- α akan diolah dengan uji statistik menggunakan program *Statistical Program Service Solution* (SPSS) Versi 26. Data penelitian yang bersifat numerik dimasukkan dan akan diuji normalitas dengan menggunakan *Saphiro-Wilk* dikarenakan sampel <50 . Apabila didapatkan hasil uji normalitas $p > 0,05$ yang dinyatakan normal, data akan dilanjutkan dengan uji homogenitas yang apabila didapatkan hasil $p > 0,05$ yang diartikan data homogen.

Apabila didapat hasil normal dan homogen data akan diuji statistik secara parametrik dengan *One Way Anova* lalu apabila didapatkan hasil $p < 0,05$ dapat diuji dengan *Post Hoc Tuckey* untuk mengetahui apakah ada perbedaan pengaruh pada masing-masing sampel. Dilihat signifikansinya, apabila $p > 0,05$ artinya H_0 diterima, namun apabila $p < 0,05$ artinya H_1 diterima.

Namun apabila saat diuji normalitas dan homogenitas didapatkan hasil tidak normal atau tidak homogen $p < 0,05$, maka dilakukan uji non-parametrik dengan menggunakan *Kruskall-Wallis*. Apabila didapatkan nilai signifikansinya $< 0,05$ akan dilanjutkan uji *Post Hoc Mann Whitney U Test*. Dilihat signifikansinya, apabila $p > 0,05$ artinya H_0 diterima, namun apabila $p < 0,05$ artinya H_1 diterima.

Lalu dilanjutkan dengan analisis korelasi untuk menentukan derajat keeratan hubungan antar variabel dengan menggunakan uji korelasi *bivariate pearson*, pada uji korelasi akan dinyatakan dengan huruf “r”, apabila didapatkan angka 0 maka disebutkan tidak terdapat hubungan (korelasi), apabila nilai mendekati angka 1 atau -1 disebutkan memiliki korelasi, apabila angka $> 0,5$ diartikan memiliki korelasi yang cukup kuat, namun apabila angka $< 0,5$ diartikan

memiliki korelasi yang lemah. Selain itu, tanda (-) menunjukkan korelasi yang berlawanan, dan tanda (+) menunjukkan korelasi yang searah.

Selain itu, penilaian korelasi dapat dilihat melalui :

1. nilai signifikansi (sig.2-tailed)
 - a. $<0,05$ = terdapat korelasi antar variabel
 - b. $>0,05$ = tidak terdapat korelasi antar variabel.
2. Dilihat berdasarkan r hitung dan r tabel,
 - a. $r \text{ hitung} > r \text{ tabel}$ = didapatkan korelasi antar variabel
 - b. $r \text{ hitung} < r \text{ tabel}$ = tidak terdapat korelasi antar variabel
3. Tanda bintang (*) pada nilai *pearson correlation*
(*)(**) = terdapat korelasi antar variabel
Tidak terdapat bintang (*) = tidak ada korelasi antar variabel

BAB V

HASIL

Penelitian ini penelitian dengan rancangan *true experimental post-test only control group design* pada tikus jantan menggunakan tikus putih galur *Sprague Dawley* yang berumur 2 – 3 bulan yang memiliki berat badan 150 – 180 gr sebanyak 30 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan yang berbeda. Kelompok kontrol positif yaitu kelompok dengan perlakuan berupa pemberian induksi DMBA tanpa diberi terapi ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*). Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok tanpa induksi DMBA dan tanpa terapi ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*). Kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok dengan induksi DMBA kemudian diberi terapi ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dengan (1) dosis 50 mg/kgBB/hari, (2) dosis 100 mg/kgBB/hari dan (3) dosis 200 mg/kgBB/hari secara sonde.

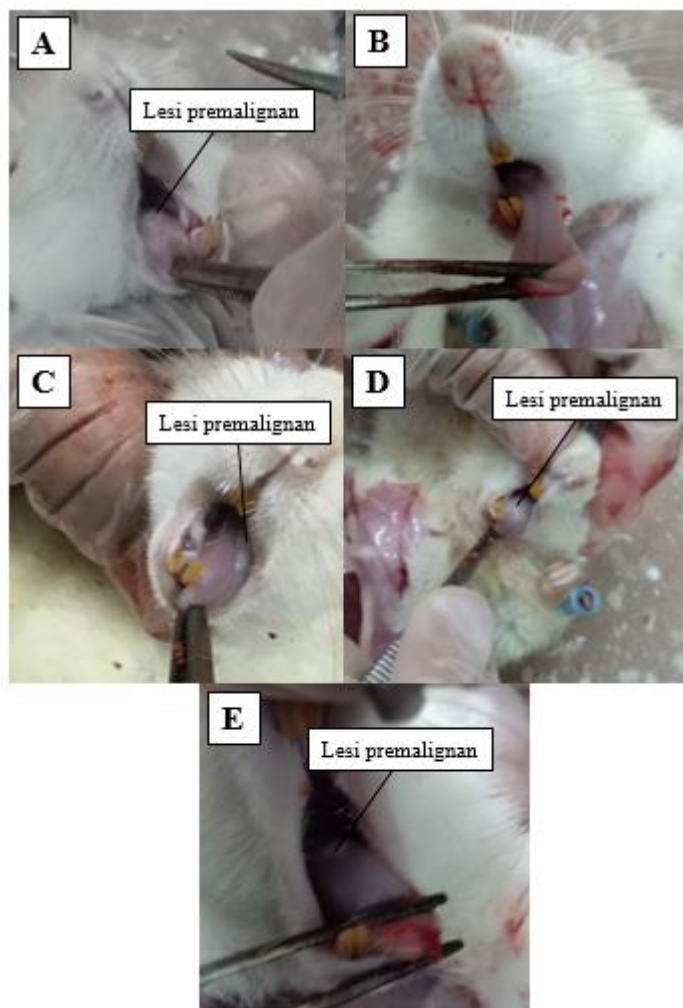
Hewan coba diaklimatisasikan selama 7 hari lalu diinduksi DMBA secara subkutan pada lidah di hari ke 8, kemudian ditunggu selama 5 minggu. Setelah itu hewan coba diberikan terapi ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) selama 14 hari. Kemudian dilakukan determinasi hewan coba dengan cara dislokasi pada leher yang kemudian dilanjutkan dengan pembedahan di daerah mulut untuk mengambil lidah hewan coba. Sampel yang didapatkan berjumlah 20 sampel (1 hewan coba mati pada kontrol negatif dan perlakuan dosis 2, lalu 5 sampel digunakan sebagai *trial* dalam pembuatan preparat imunohistokimia). Yang kemudian organ sampel yang didapat dikirimkan ke RS Dr. Soetomo untuk dilakukan pemotongan dengan mikrotom, dan setelah itu preparat yang didapat dikirim kembali ke laboratorium Patologi Anatomi Fakultas

Kedokteran Brawijaya untuk dilakukan pewarnaan imunohistokimia TNF- α . Kemudian dilakukan pengukuran TNF- α terhadap preparat dengan mikroskop. Data yang didapat kemudian dipilah dan dilakukan pengolahan dan diuji secara statistik.

5.1. Hasil Pengukuran Kadar TNF- α

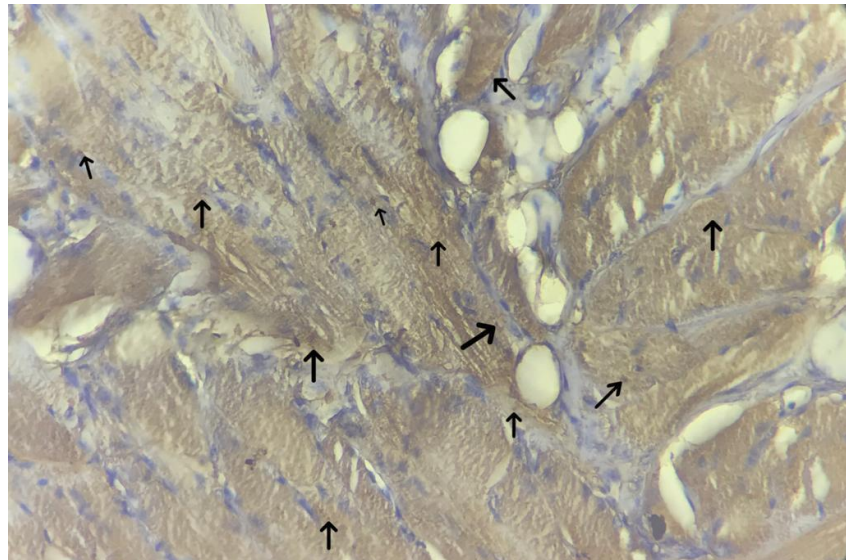
Penelitian ini dimulai dengan aklimatisasi hewan coba selama 7 hari, yang dilanjutkan dengan induksi DMBA pada hari ke 8, ditunggu selama 5 minggu, kemudian dilanjutkan dengan pemberian terapi selama 2 minggu.

Setelah proses determinasi, dilakukan pengamatan klinis pada lidah hewan coba, hasil pengamatan tertera pada gambar berikut.

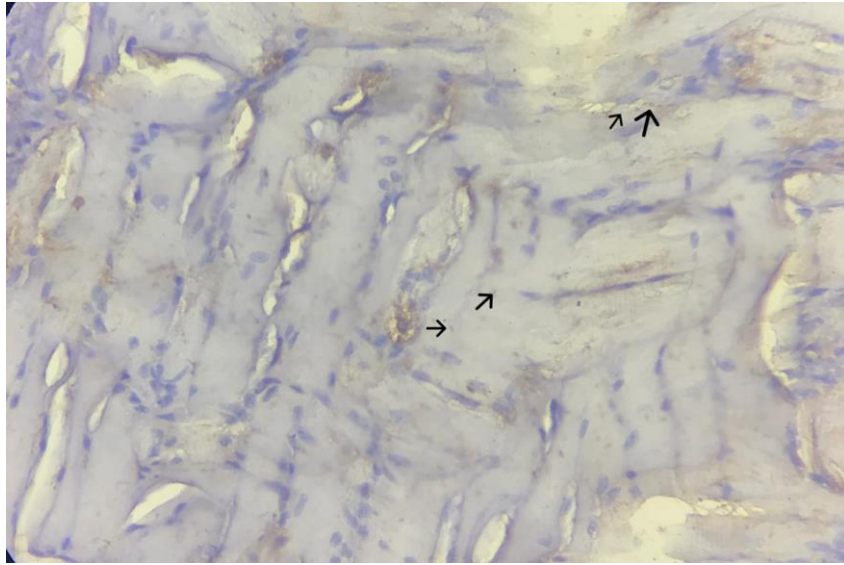


Gambar 5.1 Lidah Tikus yang diterminasi. (A) Kelompok kontrol positif. (B) kelompok kontrol negatif. (C) Kelompok perlakuan dosis 1. (D) Kelompok perlakuan dosis 2. (E) Kelompok perlakuan dosis 3. Secara klinis dapat dilihat bahwa tikus memiliki salah satu tanda dari OSCC yaitu adanya leukoplakia (plak berwarna putih) dan juga adanya peninggian pada mukosa lidah tikus.

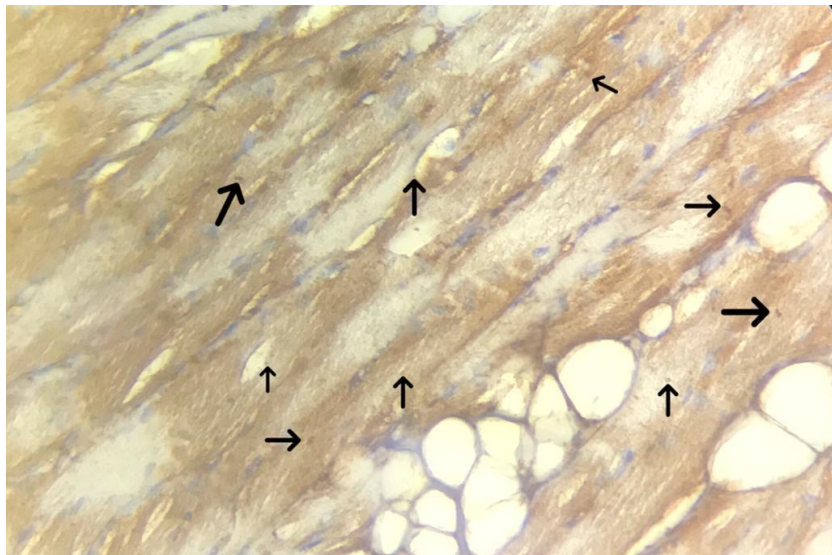
Pengukuran kadar TNF- α dilakukan dengan metode imunohistokimia dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400X dalam 10 lapang pandang. Setiap TNF- α yang ditemukan akan dihitung dengan *counter*. Dalam pengamatan dibawah mikroskop TNF- α ditandai dengan adanya bintik coklat yang merupakan sitokin TNF- α .



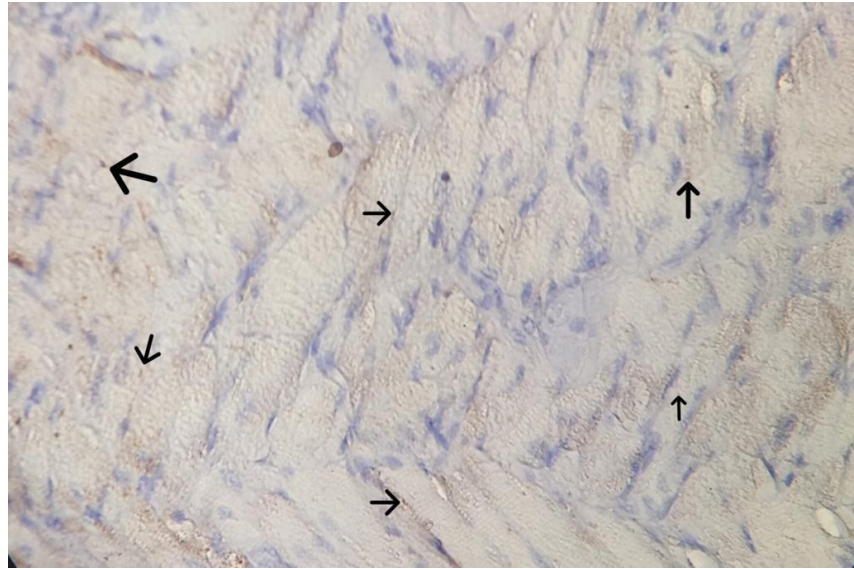
Gambar 5.2 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok kontrol positif dengan perbesaran 400x.



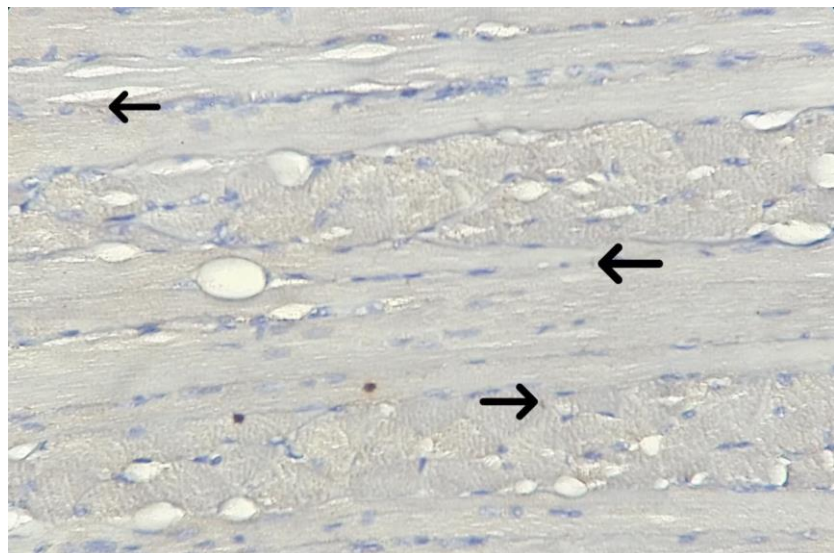
Gambar 5.3 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok kontrol negatif dengan perbesaran 400x.



Gambar 5.4 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok perlakuan dosis 1 dengan perbesaran 400x.



Gambar 5.5 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok perlakuan dosis 2 dengan perbesaran 400x.



Gambar 5.6 Gambaran mikroskopis dan temuan TNF- α pada kelompok perlakuan dosis 3 dengan perbesaran 400x.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan tikus putih galur *Sprague Dawley* yang berumur 2 – 3 bulan dengan berat badan 150 – 180 gr sebanyak 30 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan yang berbeda. Kelompok kontrol positif yaitu kelompok dengan perlakuan berupa pemberian induksi DMBA tanpa diberi terapi ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*). Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok tanpa induksi DMBA dan tanpa terapi ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*). Kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok dengan induksi DMBA kemudian diberi terapi ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dengan (1) dosis 50 mg/kgBB/hari, (2) dosis 100 mg/kgBB/hari dan (3) dosis 200 mg/kgBB/hari secara sonde.

6.1. Pengaruh Pemberian Induksi DMBA terhadap hewan coba

Pada penelitian ini didapatkan bahwa tikus yang diinduksi DMBA (kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan dosis) pada pemeriksaan klinis ditemukan adanya beberapa gejala *Oral Squamous Cell Carcinoma* (OSCC) pada kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan dosis berupa plak atau peninggian berwarna keputihan (leukoplakia), hal ini merupakan salah satu tanda adanya perkembangan OSCC yang berkembang dari sel leukoplakia (sel pre-malignan) (Neville *et al.*, 2002)

6.2. Kajian Integrasi Islam Dalam Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Krisan (*Chrysanthemum cinerariiflorum*) terhadap Kadar TNF- α pada Tikus yang Diinduksi DMBA

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) merupakan neoplasma maligna yang tumbuh dari sel epitel dan dapat tumbuh secara primer ataupun metastasis, bersifat invasif baik dirongga mulut, lidah, dasar mulut, mukosa *buccal* maupun gingiva (Gunawan *et al.*, 2020. Rehulina G *et al.*, 2015).

Sebagai umat muslim yang dilahirkan juga dibesarkan dalam agama Islam, wajib mengetahui bahwa seluruh yang ada di dunia ini merupakan takdir dari Allah SWT, baik penyakit dan sebagainya, hal ini dijelaskan dalam Surat Al-Baqarah (2) ayat 164 :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ وَالْفُلْكِ الَّتِي تَجْرِي فِي الْبَحْرِ بِمَا يَنْفَعُ النَّاسَ وَمَا أَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مِنْ مَّاءٍ فَأَحْيَا بِهِ الْأَرْضَ بَعْدَ مَوْتِهَا وَبَثَّ فِيهَا مِنْ الْمُسْحَرِ بَيْنَ السَّمَاءِ وَالْأَرْضِ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ كُلِّ دَابَّةٍ وَتَصْرِيفِ الرِّيحِ وَالسَّحَابِ

Artinya: “Sesungguhnya pada penciptaan langit dan bumi, pergantian malam dan siang, kapal yang berlayar di laut dengan (muatan) yang bermanfaat bagi manusia, apa yang diturunkan Allah dari langit berupa air, lalu dengan itu dihidupkan-Nya bumi setelah mati (kering), dan Dia tebarkan di dalamnya bermacam-macam binatang, dan perkisaran angin dan awan yang dikendalikan antara langit dan bumi, (semua itu) sungguh, merupakan tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang-orang yang mengerti”(Q.S. Al-Baqarah:164)

Tafsir pada ayat diatas menjelaskan bahwa Allah sudah memberikan bukti dan tanda sebagai wujud dan ketuhanannya, bahkan fakta-fakta ilmiah yang baru diungkap oleh peneliti juga telah diisyaratkan bahwa Allah SWT yang dapat membentuk seluruh jagat ini sampai dengan hal terkecil sekalipun.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Setelah dilakukan penelitian ini yang berupa perlakuan pada hewan coba dan dilanjutkan dengan pengamatan secara mikroskopis pemberian ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) terhadap kadar TNF- α pada tikus yang diinduksi DMBA, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dapat menurunkan kadar TNF- α pada OSCC dengan penurunan kadar TNF- α tertinggi pada pemberian ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dengan dosis 200 mg/KgBB.

6.2. Saran

Penelitian ini memiliki beberapa kekurangan dan keterbatasan dalam pelaksanaan penelitian. Beberapa saran yang diharapkan dapat diperbaiki dan dikembangkan pada penelitian dimasa yang akan datang:

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa aktif dalam daun krisan yang dapat menurunkan kadar TNF- α pada OSCC.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengatasi penurunan berat badan tikus yang disebabkan nyeri akibat induksi DMBA pada lidah untuk mencegah kematian hewan coba.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang dosis toksik dari pemberian ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*).
4. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengkonversikan dosis ekstrak daun krisan (*Chrysanthemum cinerariifolium*) dalam penggunaan sehari-hari sebagai terapi alternatif OSCC.

DAFTAR PUSTAKA

- Abul K, *et al.*, 2003. *Immunología Celular Molecular*, vol. Volume 1. 5a ed. Madrid: W B Saunders Co
- Ahmed Mohamed Malki, Samira Bou Raad, Rasha Abu-El-Ruz. 2017. *Prevention of Oral Cancer*. Springer International Publishing AG
- Alviana N., Sidharta BR., Martini T. 2016. *Test the effectiveness of antibacterial ethanol extract of Chrysanthemum of green (Chrysanthemum morifolium Syn. Dendrathera grandiflora) against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Yogyakarta: Universitas Atma Jaya Yogyakarta
- American Cancer Society. 2020. *Cancer Facts and Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society.
- Amri aji, Meriatna, Anita Sari Ferani. 2013. *Pembuatan Pewarna Makanan Dari Kulit Buah Manggis Dengan Proses Ekstraksi*. Jurnal Teknologi Kimia Unimal 2:2 1-15.
- Anastasios K. Markopoulos. 2012. *Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma*. Oral Medicine/Pathology Aristotle University of Thessaloniki, Greece
- Andiani, Yuli. 2013. *Budidaya Bunga Krisan*. Yogyakarta: Pustaka Baru Press
- Ardianta W, Hendarto H, Widjiati. 2015. *Kurkumin Menurunkan Ekspresi Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Kompleks Oosit-Kumulus Sapi*. Majalah Obstetri & Ginekologi, Vol. 23 No. 3
- Aziz, N., Kim, M.-Y., & Cho, J. Y. 2018. *Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of in vitro, in vivo, and in silico studies*. Journal of Ethnopharmacology, 225, 342–358. doi:10.1016/j.jep.2018.05.019
- Babic A, *et al.*, 2016. *Soluble tumour necrosis factor receptor type II and survival in colorectal cancer*. Br J Cancer 114:995–1002. doi: 10.1038/bjc.85
- Balkwill, F., Charles, K. A. & Mantovani, A. 2005. *Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease*. Cancer Cell. 7, 211–217
- Barnes, L., *et al.*, 2005. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press, p.172.
- Bradley JR. 2008. *TNF-mediated inflammatory disease*. J Pathol.; 214(2):149-60.

- Bui Thi Thuy Luyen, *et al.*, 2014. *Anti-inflammatory components of Chrysanthemum indicum flowers*. College of Pharmacy. South Korea
- Cesar Rivera. 2015. *Essentials of oral cancer*. International Journal of Clinical and Experimental Physiology, 8 (9), pp.11884-11894
- Chadwick M, *et al.*, 2013. *Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people*. Int J Mol Sci 14:12780–12805
- Chandra A, *et al.*, 2013. *Oral squamous cell carcinomas in age distinct population: a comparison of p53 immunoexpression*. J Cancer Res Ther. 9(4):587–91.
- Cirri, M., Bragagni, M., Mennini, P., 2012. *Development of a New Delivery System Consisting “Drug-in Cyclodextrin-in Nanostructured Lipid Carriers” for Ketoprofen Topical Delivery*. Eur J of Pharm and Biopharm 80(1): 46-53
- Deepthi G, S R K Nandan, Pavan G Kulkarni. 2019. *Salivary Tumour Necrosis Factor- α as a Biomarker in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma*. Asian Pac J Cancer Prev, **20 (7)**, 2087-2093
- Departemen Kesehatan R. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Cetakan 1.ed. Direktorat jenderal pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta
- Departemen Kesehatan. 2006. *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia*,. Vol.2, 124, Jakarta, Depkes RI
- Driemel O., *et al.*, 2007. *Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions*. JDDG, [online] 5(12), pp.1096-1100.
- Elliott, M. 2007. *The pyrethrins and related compounds. II. infra-red spectra of the pyrethrins and of other constituents of pyrethrum extract*. Journal of Applied Chemistry, 11(1), 19-23.
- Fonseca C, *et al.*, 2008. *Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas*. Surg Neurol 70:259–267
- Ganly I, *et al.*, 2009. *Tumors of the oral cavity*. In: Montgomery PQ, Evans PHR, Gullane PJ. eds. *Principles and practice of head and neck surgery and oncology*. 2nd edition. London: Informa UK Ltd;
- Garattini E, Gianni M, Terao M. 2007. *Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways basis for rational therapeutic combinations*. Curr Pharm Des 13:1375–1400

- Garcia-Salas, P. *et al.*, 2010. *A Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples*. *Molecules*, 15, 8813–8826.
- Gelband H, *et al.*, 2015. *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank;
- Giovannacci I, *et al.*, 2016. *Non-invasive visual tools for diagnosis of oral cancer and dysplasia: a systematic review*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 21:e305–15
- Gorlach, S.; Fichna, J.; Lewandowska, U. 2015. *Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs*. *Cancer Lett*, 366, 141–149
- Grdisa M., *et al.*, 2009. *Morphological and Biochemical Diversity of Dalmatian Pyrethrum (Tanacetum cinerariifolium (Trevir.) Sch.Bip.)*. *Agriculturae Conpectus Scientificus*, 74(2):73-80
- Gunawan, *et al.*, 2020. *Gambaran squamous cell carcinoma pada posterior mandibula pada radiograf panoramik*. *Jurnal Radiologi Dentomaksilofasial Indonesia*.
- Hsu YL, Wu LY, Kuo PL. *Dehydrocostuslactone, a medicinal plant-derived sesquiterpene lactone, induces apoptosis coupled to endoplasmic reticulum stress in liver cancer cells*. *J Pharmacol Exp Ther* 2009
- Huang CS, *et al.*, 2007. *Lycopene inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and down-regulates the binding activity of nuclear factor-kappa B and stimulatory protein-1*. *J Nutr Biochem*
- Huriawati Hartanto. 2002. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium* (Terjemahan). ed 11. Jakarta : EGC, ; 341-71.
- Hwang ES, Lee HJ. 2006. *Inhibitory effects of lycopene on the adhesion, invasion, and migration of SK-Hep1 human hepatoma cells*. *Exp Biol Med* (Maywood)
- Isela Martínez-Reza, Lorenza Díaz, Rocío García-Becerra. 2017. *Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer*. *Journal of Biomedical Science* (2017) 24:90 DOI 10.1186/s12929-017-0398-9
- Ji-Yun Cha, *et al.*, 2018. *Chrysanthemum indicum L. ethanol extract reduces high-fat diet-induced obesity in mice*. College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute. Republic of Korea
- Joshi, M., Patravale, V., 2008. *Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Based Gel of Celecoxib*. *Inter J of Pharm* 346: 124–132.

- Juretic M, *et al.*, 2013. *Salivary levels of TNF-[alpha] and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions*. Folia Biol
- K Zauhani, Suryono, Tamsuri A. 2019. *Ekstrak Propolis Memperbaiki Profil Berat Badan Tikus Model Kanker Payudara yang Diinduksi dengan 7,12-dimethylbenz(a) anthracene (DMBA)*. Media Litbangkes, Vol. 29 No. 2
- Kalia, R., Katnoria, J.K., Nagpal, A.K. 2016. *Antitumor Activity of Aqueous Leaf Extract of Different Cultivar of Chrysanthemum morifolium R. using Potato Disc Tumor Assay*. Journal pharmaceutical sciences and research. 1262-1265
- Katno, 2008. *Tingkat manfaat, keamanan dan efektifitas tanaman obat dan obat tradisional*. Karanganyar: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI
- Kaur J, Jacobs R. 2015. *Proinflammatory cytokine levels in oral lichen planus, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis*. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg
- Kim, J. W., *et al.*, 2011. 5. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 26: 42-47
- King RJ, Robins MW. 2006. *Cancer Biology*, 3rd ed. England, Pearson Education Limited
- Krishnan R, *et al.*, 2014. *Association of serum and salivary tumor necrosis factor- α with histological grading in oral cancer and its role in differentiating premalignant and malignant oral disease*. Asian Pac J Cancer Prev
- Landskron G, *et al.*, 2014. *Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment*. J Immunol Res; 2014: 149185.
- Lauenborg B, *et al*, 2015. *Malignant T cells express lymphotoxin alpha and drive endothelial activation in cutaneous T cell lymphoma*. Oncotarget 6:15235–49. doi:10.18632/oncotarget.3837
- Li ZF, *et al.*, 2009. *Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma MHCC97H cells with Chrysanthemum indicum extract*. World J gastroenterol 15: 4538-4546,
- Lin, L.Z. and Harnly, J.M. 2010. *Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (Chrysanthemum morifolium Ramat)*. Food Chemistry, Vol. 120, pp. 319–326

- Listiyana A, *et al.*, 2019. *Anticancer Activities And Metabolite Fingerprinting Of UPLC-Qtof-MS/MS Method From Chrysanthemum Cinerariifolium (Trev)*. Department of Pharmacy, Faculty of Medical and Health Science, Universitas Islam Negeri Mulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia
- Lu R, *et al.*, 2011. *Lycopene: features and potential significance in the oral cancer and precancerous lesions*. J Oral Pathol Med.
- Madhavan P. Nair, *et al.*, 2006. *The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF- κ B System*. Clinical and vaccine immunology. American Society for Microbiology
- Masayeva BG, *et al.* 2004. *Gene expression alterations over large chromosomal regions in cancers include multiple genes unrelated to malignant progression*. Proc Natl Acad Sci USA 101:8715-8720.
- Mayne ST, Playdon MC, Rock CL. 2016. *Diet, nutrition, and cancer: past, present and future*. Nat Rev Clin Oncol.;13:504–15.
- Mei Syafriadi. 2008. *Pathogenesis Of Oral Cancer*. Indonesian journal of dentistry
- Mercogliano MF, *et al.*, 2020. *Tumor Necrosis Factor α Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer*. Front. Oncol. 10:584
- Millena Prata Jammal, *et al.*, 2015. *Immunohistochemical Staining Of Tumor Necrosis Factor- α And Interleukin-10 In Benign and malignant ovarian neoplasms*. ONCOLOGY LETTERS 9: 979-983,
- Mueller NE. 2003. *Cancers caused by infections: unequal burdens* Cancer Epidemiol Biomark Prev.; 12(3):237s.
- Muti'ah R *et al.*, 2020. *Inhibition of Cell Cycle and Induction of Apoptosis y Ethanol Leaves Extract of Chrysanthemum cinerariifolium (Trev.) In T47D Breast Cancer Cells*. Indonesian Journal of Pharmacy. Vol 31(1) 2020:1-10
- Nabavi, S.M. *et al.*, 2018. *Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering*. Biotechnol. Adv. 2018, doi:10.1016/j.biotechadv.11.005.
- Nagaishi T, *et al.*, 2016. *Epithelial nuclear factor- κ B activation in inflammatory bowel diseases and colitis-associated carcinogenesis*. Digestion 93:40–6. doi:10.1159/ 000441670
- Naggar A, *et al.*, 2017. *WHO Classification of Head and Neck Tumours (4th Edition)*. 4th ed. Lyon: IARC;

- Naugler, W. E. *et al.* 2007. *Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production*. Sci. 317, 121–124
- Neville, B. W. *et al.*, 2002. *Oral and Maxillofacial Pathology (2nd ed)*. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company
- Ningsih, Indah Yulia. 2016. *Ethnopharmacy Study Of Medicinal Plants Used By Tengger Tribe In Lumajang And Malang District, East Java*. Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jember
- Noorwati, S. 2007. *Kemoterapi, Manfaat dan Efek Samping. Dharmais Cancer Hospital*. Jakarta.
- Oliveira-Marques, V. *et al.*, 2009. *Modulation of NF-kappaB-dependent gene expression by H2O2: A major role for a simple chemical process in a complex biological response*. Antioxid Redox Signal, 11, 2043–2053.
- Petersen PE. 2009. *Oral cancer prevention and control – the approach of the World Health Organization*. Oral Oncol.
- Poh CS, *et al.*, 2008. *Biopsy and Histopathologic Diagnosis Of Oral Premalignant and Malignant Lesion*. Journal Of the Canadian Dental Association, vol.74, no. 3, pp. 283-288
- Pontes HA, *et al.*, 2011. *Kaposi sarcoma and paracoccidioidomycosis in the same fragment of oral mucosa biopsy: a rare association in human immunodeficiency virus-positive patient*. A case report. Diagn Microbiol Infect Dis.;69(2):196–9.
- Purdue MP, *et al.*, 2013. *A prospective study of 67 serum immune and inflammation markers and risk of non-Hodgkin lymphoma*. Blood 122:951–7. doi:10.1182/ blood-2013-01-481077
- Putri Istianingrum, Damanhuri, Lita Soetopo. 2013. *The Effect Of Seeds Generation On Growth And Flowering Of Chrysanthemum (Chrysanthemum) Rhino Varieties*. Universitas Brawijaya ; Indonesia
- Ramos-Vara, J.A. 2005. *Technical Aspect of Immunohistochemistry*. Vet. Pathol. Vol 42: 405-426
- Rehulina Ginting, Betty, Michelle. 2015. *Karakteristik karsinoma sel skuamosa Rongga mulut*. Jurnal Ilmiah PANMED: USU Medan
- Rhodus NL, *et al.*, 2005. *NF- κ B dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma*. Cancer Detect Prev

- Rivas MA, *et al.*, 2007. *TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/ P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways.* Exp Cell Res (2008) 314:509–29. doi:10.1016/j.yexcr..10.005
- Rivera C. 2015. *Essentials of oral cancer.* Int J Clin Exp Pathol.;8(9):11884–94.
- Rodriguez-Garcia, C.; Sanchez-Quesada, C. 2019. *Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies.* Antioxidants, 8, E137, doi:10.3390/antiox8050137
- Rosanti, D. 2008. *Morfologi Tumbuhan.* Jakarta:Erlangga
- Rumondang, M., D. Kusrini, dan E. Fachriyah. 2013. *Isolasi, Identifikasi, Dan Uji Antibakteri Senyawa Triterpenoid Dari Ekstrak n-Heksana Daun Tempuyung (Sonchus arvensis L.).* Chem Info. 1:156- 164.
- Salminen, A., *et al.*, 2008. *Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential.* Cellular and Molecular Life Sciences, 65(19), 2979–2999. doi:10.1007/s00018-008-8103-5
- Sankalp A. Gharat, Munira Momin, & Chintan Bhavsar. 2016. *Oral Squamous Cell Carcinoma: Current Treatment Strategies and Nanotechnology-Based Approaches for Prevention and Therapy.* College of Pharmacy, Mithibai College Campus
- Sarker SD, LatifZ, & Gray AI. 2006. *Natural products isolation.* In : sarker SD, Latif Z & Gray AI, editors. *Natural products isolation.* 2nd ed. Totowa (New Jersey). Humana Press Inc. hal 6-10, 18
- Sau A, *et al.*, 2016. *Persistent activation of NF- κ B in BRCA1-deficient mammary progenitors drives aberrant proliferation and accumulation of DNA damage.* Cell Stem Cell: 19(1):52–65.
- Shanmugam M, *et al.*, 2012. *Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer.* Cancer Lett 320:158–170
- Sheng Y, Li F and Qin Z. 2018. *TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors.* Front. Immunol. 9:1170. doi: 10.3389/fimmu.2018.0117
- Sheth SH, *et al.*, 2015. *Chemoprevention targets for tobacco-related head and neck cancer: past lessons and future directions.* Oral Oncol.;51(6):557–64.
- Sirait A. 2013. *Faktor Risiko Kanker/Tumor Rongga Mulut dan Tenggorokan di Indonesia.* Media Litbangkes.

- Smith AJ, Oertle J, Prato D. 2014. *Environmental carcinogens and the kinds of cancers they cause*. Open J Oncol.;3(1).
- Soepardi EA, et al., 2007. *Buku ajar ilmu kesehatan telinga hidung tenggorok kepala leher*. Edisi 6. Jakarta: Balai penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia;
- Souto E.B. Muller R.H. 2007. *Lipid Nanoparticles (Solid lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers) for Cosmetic, Dermal, and Transdermal Applications*. Drug and Pharm Sci 166: 213-232
- Sri Lestari, Irma Primawati, Eryati Darwin. 2009. *Perbandingan Ekspresi Tumor Necrosis Factor- α (Tnf- α), Interleukin-1 (Il-1), Dan Interleukin-10 (Il-10) Pada Lesi Dan Non-Lesi Psoriasis Vulgaris Di Rs. Dr. M. Djamil, PADANG*. Majalah Kedokteran Andalas No.1. Vol.33
- Sugerman P.B, Savage, NW. 1999, *Current Concept in Oral Cancer*, ADJ
- Sun J. 2007. *D-limonene: safety and clinical application*. Altern Med Rev 12:259–264
- Syed SA, et al., 2015. *Oral squamous cell carcinoma; clinicopathological parameters and agnor status in grading*. Professional Med J
- Teuku Husni T.R. 2009. *Diagnosis dan Penatalaksanaan Tumor Ganas Lidah*. Jurnal Kedokteran Syiah Kuala.
- Ukiya M., et al., 2002. *Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers*. Cancer Letters, 177(1):7-12
- Van Herreweghe, et al., 2010. *Tumor Necrosis Factor-Mediated Cell Death: To Break or to Burst, That's the Question*. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS 67. 1567-1579.
- Vanja VB. 2015. *The significance of salivary cytokines in oral leukoplakia*. J Autacoids Horm
- Wang N, Liang H, Zen K. 2014. *Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance*. Front Immunol; 5: 614.
- Warnakulasuriya S. 2009. *Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer*. Oral Oncology.
- Warshawsky S, Landolph JR. 2006. *Molecular Carcinogenesis and the Molecular Biology of Human Cancer*, 1st ed. Boca Raton USA, Taylor & Francis Group,

- WHO. 2018. *Press Release Latest Global Cancer Data*. France: Cours Albert Thomas
- WHO. 2018. *The Global Cancer Observatory*
- Wood, N.K and Sawyer D.R., 1997, *Oral Cancer, dalam Wood, N.K. dan Goaz, P.W. (eds): Differential Diagnosis Of Oral and Maxillofacial lesion*. Mosby Inc., St. Louis Missouri
- Xia Wang, Young Lin. 2008. *Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?*. Acta Pharmacol Sin.
- Xie, Y.Y., *et al.*, 2009. *Cytotoxic Activity of Flavonoids from The Flowers of Chrysanthemum morifolium on Human Colon Cancer Colon 205 Cells*. Journal of Asian Natural Products Research, Vol.11, No. 9, pp. 771-778
- Yahfoufi, N. *et al.*, 2018. *The Immunomodulatory and Anti Inflammatory Role of Polyphenols*. Nutrients, 10, E1618, doi:10.3390/nu10111618.
- Yani C. Rahayu, Elza I, Auerkari. 2004. *Teknik Imunohistokimia sebagai pendeteksi antigen spesifik penyakit infeksi*. Indonesian Journal of Dentistry ; 11(2): 76-82
- Yerlikaya PO. *et al.*, 2017. *Breast Cancer and Flavonoids as Treatment Strategy*. From Biology to Medicine, 2:305-326
- Zhang T, *et al.*, 2018. *Aberrant frequency of TNFR2 (+) Treg and related cytokines in patients with CIN and cervical cancer*. Oncotarget 9:5073–83. doi:10.18632/oncotarget.23581
- Zhi-Dong Wang, *et al.*, 2009. *Chrysanthemum indicum ethanolic extract inhibits invasion of hepatocellular carcinoma via regulation of MMP/TIMP balance as therapeutic*. Departemen of General Surgery: China
- Zhuming G, Quan Z. 2008. *Karsinoma lidah*. Dalam: Desen W, ed. Alih bahasa: Japaries W. Onkologi klinis. Edisi 2. Beijing: Science Publication;.
- Zong-Fang Li, *et al.*, *Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human HCC MHCC97H cells with Chrysanthemum indicum extract*. World J Gastroenterol

LAMPIRAN

Lampiran 1. Penghitungan Dosis dicampur dengan Na CMC

a. Dosis stok volume sonde (seluruh kelompok)

= dosis sonde (ml) x jumlah tikus semua kelompok perlakuan (ekor) x
lama pemberian (hari)

$$= 1 \text{ ml} \times 18 \text{ ekor} \times 14 \text{ hari}$$

$$= 252 \text{ ml}$$

Total stok untuk menyonde seluruh kelompok perlakuan selama
14 hari adalah 252 ml

b. Dosis stok volume sonde (setiap kelompok)

= dosis sonde (ml) x jumlah per kelompok perlakuan (ekor) x lama
pemberian (hari)

$$= 1 \text{ ml} \times 6 \text{ ekor} \times 14 \text{ hari}$$

$$= 84 \text{ ml}$$

Total stok untuk menyonde satu kelompok perlakuan selama 14
hari adalah 84 ml

c. Dosis perlakuan ekstrak daun krisan

$$1. \text{ Dosis 1} = 50 \text{ mg/kgBB} \rightarrow 0.00005 \text{ gr/grBB}$$

$$2. \text{ Dosis 2} = 100 \text{ mg/kgBB} \rightarrow 0.0001 \text{ gr/grBB}$$

$$3. \text{ Dosis 3} = 200 \text{ mg/kgBB} \rightarrow 0.0002 \text{ gr/grBB}$$

d. Perhitungan ekstrak daun krisan setiap dosis perlakuan (selama 14 hari)

$$1. \text{ Dosis 1} = 0.00005 \text{ gr/ 1 ml} = x \text{ gr/ 84 ml}$$

$$X = 0.0042 \text{ gr}$$

$$2. \text{ Dosis 2} = 0.0001 \text{ gr/ 1 ml} = x \text{ gr/ 84 ml}$$

$$X = 0.0084 \text{ gr}$$

$$3. \text{ Dosis 3} = 0.0002 \text{ gr/ 1 ml} = x \text{ gr/ 84 ml}$$

$$X = 0.0168 \text{ gr}$$

$$\text{Total kebutuhan ekstrak} = 0.0042 + 0.0084 + 0.0168 = 0.0294$$

Jadi stok dosis yang diperlukan selama 14 hari yaitu 0.0294

e. Perhitungan stok larutan ekstrak daun krisan

1. Dosis 3

$$0.0294 \text{ gr} \times 1 \text{ ml} = 0.0002 \text{ gr} \times K \text{ ml}$$

$$K = 147 \text{ ml}$$

0.0294 gr ekstrak daun krisan yang dilarutkan dalam Na CMC sampai volumenya 147 ml. Lalu diambil sebanyak 84 ml untuk dosis 3, untuk di sonde selama 14 hari. Sisa stok yaitu 63 ml akan diencerkan dan dipakai untuk dosis berikutnya

2. Dosis 2

$$0.0002 \times (147 - 84) \text{ ml} = 0.0001 \text{ gr} \times K \text{ ml}$$

$$0.0002 \times 63 \text{ ml} = 0.0001 \text{ gr} \times K \text{ ml}$$

$$K = 126 \text{ ml}$$

Sisa larutan dosis 3 yaitu 63 ml, diencerkan menggunakan Na CMC sampai volume nya 126 ml. Kemudian akan diambil sebanyak 84 ml untuk stok dosis 2. Dan sisanya adalah 42 ml yang akan dipakai untuk dosis berikutnya.

3. Dosis 1

$$0.0001 \text{ gr} \times (126 - 84) = 0.00005 \text{ gr} \times K \text{ ml}$$

$$0.0001 \text{ gr} \times 42 \text{ ml} = 0.00005 \text{ gr} \times K \text{ ml}$$

$$K \text{ ml} = 84 \text{ ml}$$

Sisa larutan pada dosis 2 adalah 42 ml, yang diencerkan menggunakan Na CMC sampai volumenya 84 ml. Dan akan diambil sebagai dosis 1 sehingga, tidak ada larutan yang tersisa. Sisa larutan 0 ml.

Lampiran 2. Keterangan *Ethical Clearance*

	<p style="text-align: center;"> FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Kampus 3 FKIK Gedung Ibnu Thufail Lantai 2 Jalan Locari, Tlekung Kota Batu E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id </p>
	<p style="text-align: center;"> KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 001/EC/KEPK-FKIK/2021 </p>

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN(KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

Judul	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Krisan (<i>Chrysanthemum Cinerariiflorum</i>) Sebagai Antikanker Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Secara In Vivo
Sub Judul	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Krisan (<i>Chrysanthemum Cinerariiflorum</i>) Sebagai Antikanker Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Secara In Vivo
Peneliti	<ul style="list-style-type: none"> - drg. Anik Listiyana, M.Biomed - drg. Risma Aprinda K., M.Si - Nadya Dharmayanti - Al Mazida Fauzil Aishaqcna - Anggun Putri Maulana Ahmad - Rizkia Milladina Hidayatullah
Unit / Lembaga	Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Tempat Penelitian	UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Malang, 11 Januari 2021
Ketua


dr. Arvin Ainur F, M.Biomed
NIP. 19800203200912 2 002

Keterangan :

- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.
- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 3. Surat Determinasi Daun Krisan



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/093A/102.7/2020
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Krisan**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : FARIDA RAHMA SALSABILA
NIM : 16670011
Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman bunga krisan/ piretrum

Kingdom : Plantae
Sub Kingdom : Tracheobionta (berpembuluh)
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Asterales
Suku : Asteraceae
Marga : Tanacetum
Jenis : *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trevir.) Vis.
Sinonim : *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.; *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.; *Pyrethrum cinerariifolium* Trevir

Nama Umum : Bunga piretrum, krisan, seruni.

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23a-1b-6b-7b-9b-10b.

2. Morfologi : Habitus: Terna, tinggi 0,5-1 m. Batang: Tegak, bulat, sedikit bercabang, permukaan kasar, hijau. Daun: Tunggal, berseling, lonjong, ujung runcing, pangkal membulat, tepi bertoreh, panjang 7-13 cm, lebar 3-6 cm pertulangan menyirip, tebal, permukaan kasar, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk cawan, di ketiak daun atau di ujung batang, garis tengah 3-5 cm, kelopak bentuk cawan, ujung runcing, hijau, benang sari dan putik halus, berkumpul di tengah bunga, mahkota lonjong, lepas, panjang 3-8 mm, putih. Buah: Lonjong, kecil, ditutupi selaput buah, masih muda putih setelah tua hitam. Biji: Lonjong, kecil, hitam. Akar: Tunggang, putih.

3. Bagian yang digunakan : Daun.

4. Penggunaan : Penelitian.

5. Daftar Pustaka

- Backer, C.A. & Bakhuizen Van Den Brink, R.C. 1963. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol I. N.V.P. Noordhoff, Groningen.
- Backer, C.A. & Bakhuizen Van Den Brink, R.C. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol. II. N.V.P. Noordhoff, Groningen.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 22 Januari 2020

An. Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu

Kepala Seksi Pelayanan Laboratorium Herbal,



Fitria Rahmawati, S.Farm., Apt.
NIP. 19900430 201403 2 002

Lampiran 4. Berat Badan Tikus Selama Perlakuan

Minggu	Berat Badan (gram)				
	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Minggu 1	174,10	192,20	179,90	175,40	180,90
Minggu 2	167,80	208,60	190,20	168,80	186,60
Minggu 3	172,30	215,60	199,20	174,90	199,20
Minggu 4	180,30	222,80	206,93	174,73	198,00
Minggu 5	193,20	231,06	218,14	184,91	207,66
Minggu 6	199,37	240,26	228,89	195,57	217,14
Minggu 7	209,31	242,86	235,63	202,77	224,06
Minggu 8	223,97	250,17	240,66	205,60	232,14

Lampiran 5. Hasil Pengukuran Kadar TNF- α

Kelompok perlakuan	Sampel	Lapang pandang	Rata-rata Kadar TNF- α per-lapang pandang (μ m)	Rata-rata Kadar TNF- α per – sampel	Rata-rata Kadar TNF- α per – kelompok perlakuan
Kontrol positif	1	1	56	59,4	56,75
		2	55		
		3	53		
		4	60		
		5	52		
		6	70		
		7	52		
		8	79		
		9	64		
		10	53		
	2	1	61	56	
		2	56		
		3	72		
		4	50		
		5	61		
		6	46		
		7	51		
		8	55		
		9	48		
		10	60		
	3	1	47	56,2	
		2	55		
		3	54		

		4	67			
		5	63			
		6	68			
		7	70			
		8	59			
		9	35			
		10	44			
	4	1	58	55,4		
		2	60			
		3	59			
		4	73			
		5	89			
		6	46			
		7	45			
		8	51			
		9	41			
		10	31			
	Kontrol negatif	1	1	11		9,6
			2	14		
3			7			
4			7			
5			8			
6			14			
7			10			
8			6			
9			10			
10			9			
2		1	12	10,8		
		2	10			
		3	11			
		4	14			
		5	11			
		6	8			
		7	9			
		8	9			
		9	11			
		10	13			
3		1	8	8,9		
		2	13			
		3	13			
		4	8			
		5	13			
		6	6			

		7	4		
		8	11		
		9	7		
		10	6		
	4	1	6	9,3	
		2	9		
		3	13		
		4	7		
		5	7		
		6	8		
		7	12		
		8	10		
		9	12		
		10	9		
Dosis 1	1	1	31	40	45,125
2		51			
3		42			
4		40			
5		45			
6		32			
7		48			
8		24			
9		46			
10		41			
2	1	53	46,1		
	2	46			
	3	47			
	4	57			
	5	37			
	6	48			
	7	47			
	8	40			
	9	37			
	10	49			
3	1	35	48,7		
	2	36			
	3	43			
	4	43			
	5	30			
	6	78			
	7	56			
	8	53			
	9	59			

		10	54		
	4	1	44	45,7	
		2	56		
		3	51		
		4	45		
		5	42		
		6	33		
		7	44		
		8	43		
		9	49		
		10	50		
Dosis 2	1	1	25	20,4	25,025
		2	25		
		3	26		
		4	25		
		5	27		
		6	27		
		7	30		
		8	20		
		9	33		
		10	26		
	2	1	25	27,4	
		2	26		
		3	27		
		4	34		
		5	21		
		6	32		
		7	41		
		8	21		
		9	25		
		10	22		
	3	1	40	26,8	
		2	26		
		3	25		
		4	28		
		5	35		
		6	34		
		7	16		
		8	26		
		9	20		
		10	18		
	4	1	16	25,5	
		2	27		

		3	25		
		4	29		
		5	31		
		6	33		
		7	29		
		8	22		
		9	21		
		10	22		
Dosis 3	1	1	16	14,8	16,4
		2	11		
		3	14		
		4	16		
		5	18		
		6	14		
		7	13		
		8	18		
		9	16		
		10	12		
	2	1	14	14,7	
		2	15		
		3	17		
		4	19		
		5	13		
		6	14		
		7	15		
		8	15		
		9	11		
		10	14		
	3	1	19	18,4	
		2	25		
		3	14		
		4	16		
		5	23		
6		25			
7		15			
8		16			
9		15			
10		16			
4	1	25	17,7		
	2	16			
	3	14			
	4	11			
	5	10			

		6	11		
		7	20		
		8	21		
		9	25		
		10	24		

**Lampiran 6. Analisis Statistik Pemberian Ekstrak Daun Krisan
(*Chrysanthemum cinerariifolium*) terhadap Kadar TNF- α pada Tikus yang
Diinduksi DMBA**

1. Analisis deskriptif

Descriptives

	DOSIS_EKSTRAK	Statistic	Std. Error
KADAR_TNFA	KONTROL +	Mean	56,750
		95% Confidence Interval for Mean	
		Lower Bound	53,887
		Upper Bound	59,613
		5% Trimmed Mean	56,678
		Median	56,100
		Variance	3,237
		Std. Deviation	1,7991
		Minimum	55,4
		Maximum	59,4
		Range	4,0
		Interquartile Range	3,1
		Skewness	1,782
		Kurtosis	2,619
	KONTROL -	Mean	9,650
		95% Confidence Interval for Mean	
		Lower Bound	8,348
		Upper Bound	10,952
		5% Trimmed Mean	9,628
		Median	9,450
		Variance	,670
		Std. Deviation	,8185
		Minimum	8,9
		Maximum	10,8
		Range	1,9
		Interquartile Range	1,5

	DOSIS 1	Skewness	1,284	1,014
		Kurtosis	1,948	2,619
		Mean	45,125	1,8332
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	39,291
			Upper Bound	50,959
		5% Trimmed Mean	45,211	
		Median	45,900	
		Variance	13,443	
		Std. Deviation	3,6664	
		Minimum	40,0	
		Maximum	48,7	
		Range	8,7	
		Interquartile Range	6,6	
		Skewness	-1,188	1,014
		Kurtosis	2,258	2,619
	DOSIS 2	Mean	25,025	1,5918
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	19,959
			Upper Bound	30,091
		5% Trimmed Mean	25,150	
		Median	26,150	
		Variance	10,136	
		Std. Deviation	3,1837	
		Minimum	20,4	
		Maximum	27,4	
		Range	7,0	
		Interquartile Range	5,6	
		Skewness	-1,649	1,014
		Kurtosis	2,702	2,619
	DOSIS 3	Mean	16,400	,9635
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	13,334
			Upper Bound	19,466
		5% Trimmed Mean	16,383	
		Median	16,250	
		Variance	3,713	
		Std. Deviation	1,9270	
		Minimum	14,7	
		Maximum	18,4	
		Range	3,7	
		Interquartile Range	3,5	

Skewness	,111	1,014
Kurtosis	-5,338	2,619

2. Hasil Uji Normalitas (*Saphiro-Wilk*)

Tests of Normality				
		Shapiro-Wilk		
	DOSIS_EKSTRAK	Statistic	df	Sig.
KADAR_TNFA	KONTROL +	,797	4	,097
	KONTROL -	,914	4	,506
	DOSIS 1	,906	4	,463
	DOSIS 2	,831	4	,171
	DOSIS 3	,822	4	,147

a. Lilliefors Significance Correction

3. Hasil Uji Homogenitas (*Levene*)

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
KADAR_TNFA	Based on Mean	1,419	4	15	,275
	Based on Median	,635	4	15	,645
	Based on Median and with adjusted df	,635	4	8,151	,651
	Based on trimmed mean	1,243	4	15	,335

4. Hasil Uji *One Way ANOVA*

ANOVA					
KADAR_TNFA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6265,683	4	1566,421	251,042	,000
Within Groups	93,595	15	6,240		
Total	6359,278	19			

5. Hasil Uji *Post Hoc* Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KADAR_TNFA

(I) DOSIS_EKSTRAK	(J) DOSIS_EKSTRAK	Mean	Std.	Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
KONTROL +	KONTROL -	47,1000*	1,7663	,000	41,646	52,554
	DOSIS 1	11,6250*	1,7663	,000	6,171	17,079
	DOSIS 2	31,7250*	1,7663	,000	26,271	37,179
	DOSIS 3	40,3500*	1,7663	,000	34,896	45,804
KONTROL -	KONTROL +	-47,1000*	1,7663	,000	-52,554	-41,646
	DOSIS 1	-35,4750*	1,7663	,000	-40,929	-30,021
	DOSIS 2	-15,3750*	1,7663	,000	-20,829	-9,921
	DOSIS 3	-6,7500*	1,7663	,012	-12,204	-1,296
DOSIS 1	KONTROL +	-11,6250*	1,7663	,000	-17,079	-6,171
	KONTROL -	35,4750*	1,7663	,000	30,021	40,929
	DOSIS 2	20,1000*	1,7663	,000	14,646	25,554
	DOSIS 3	28,7250*	1,7663	,000	23,271	34,179
DOSIS 2	KONTROL +	-31,7250*	1,7663	,000	-37,179	-26,271
	KONTROL -	15,3750*	1,7663	,000	9,921	20,829
	DOSIS 1	-20,1000*	1,7663	,000	-25,554	-14,646
	DOSIS 3	8,6250*	1,7663	,002	3,171	14,079
DOSIS 3	KONTROL +	-40,3500*	1,7663	,000	-45,804	-34,896
	KONTROL -	6,7500*	1,7663	,012	1,296	12,204
	DOSIS 1	-28,7250*	1,7663	,000	-34,179	-23,271
	DOSIS 2	-8,6250*	1,7663	,002	-14,079	-3,171

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

6. Hasil Uji Korelasi *Bivariate Pearson*

Correlations

		dosis_ekstrak	kadar_TNFA
dosis_ekstrak	Pearson Correlation	1	-,518*
	Sig. (2-tailed)		,019
	N	20	20
kadar_TNFA	Pearson Correlation	-,518*	1
	Sig. (2-tailed)	,019	
	N	20	20

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Lampiran 7. Dokumentasi



Proses Aklimatisasi



Pembuatan dan induksi DMBA



Hasil Ekstrak Kental Daun Krisan



Pembuatan Na-CMC 0,5%



Penyondean Ekstrak



Determinasi Hewan Coba